

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA



TESIS DOCTORAL

EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO PRENATAL DEL MIELOMENINGOCELE

José Luis Encinas Hernández

Directores:
Manuel López Santamaría
y Juan Antonio Tovar Larrucea

Madrid, 2017

Este trabajo ha sido financiado gracias a las ayudas recibidas durante 10 años de la Fundación Mutua Madrileña (FMM) y del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Por orden cronológico:

- 1. CONTRATO POSTFORMACIÓN SANITARIA ESPECIALIZADA DEL FIS 2007-2010** de tres años de duración orientado a la formación clínica en terapia fetal y en técnicas de laboratorio así como en el desarrollo del modelo de mielomeningocele en oveja y de todas sus posibles líneas dentro del Grupo de Malformaciones Congénitas de la Unidad de I+d del HULP.
- 2. EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO PRENATAL DEL MIELOMENINGOCELE.** FMM 2007.
- 3. ESTUDIO DEL DESARROLLO NEURONAL CEREBRAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE MIELOMENINGOCELE CORREGIDO PRENATALMENTE Y DE SU EVOLUCIÓN SEGÚN EL TIPO DE ABORDAJE QUIRÚRGICO.** FIS 2007.
- 4. ESTUDIO DEL POTENCIAL NEUROPROTECTOR E INMUNOMODULADOR LOCAL DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN LA CIRUGÍA FETAL DEL MIELOMENINGOCELE DE UN MODELO TERATOGÉNICO.** FIS 2012.
- 5. EL ESTUDIO DEL POTENCIAL NEUROPROTECTOR E INMUNOMODULADOR LOCAL DEL TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y SUS IMPLICACIONES EN LA CIRUGÍA FETAL DE LOS DEFECTOS DEL TUBO NEURAL.** FMM 2012.

AGRADECIMIENTOS

A Belén, Alejandra y Elena que son lo mas importante que tengo y que tendré

A mi madre que sé que se preocupa por nosotros

A Tere que ha cuidado mucho de las niñas mientras yo escribía

A Luisfe, Ane y Carlos

A Carlota Largo, que me hizo caso al instante cuando quise empezar el primer proyecto

A Delia Aguado que hizo extraordinariamente algo nuevo en nuestro centro

A Mariana de Abreu que completó la labor de Delia

A Pablo, Pedro, Toñi e Isa que no pueden mejorar su parte porque mejorarla es imposible

A Leo que me enseñó a escribir proyectos de investigación y corrigió este trabajo

A Jose Luis Peiró por ser mi amigo, enseñarme los fundamentos de los procedimientos fetales, ayudar a levantar mi proyecto en mi hospital y dar garantía de éxito a procedimientos en humanos que nunca habíamos hecho. De manera desinteresada puso su conocimiento a nuestra disposición, lo que perdurará en forma de mejores tratamientos para niños de una ciudad que no es la suya

A César Fontecha por enseñarme el modelo de oveja en Bellaterra

Al Dr. Mariño que me animó a hacer estos trabajos

A Juan Tovar por que fue quien dijo '»Cirugía Fetal» por primera vez

A Manolo López por apoyarme en esto y en otras muchas cosas

Al Dr. Ruza al que conozco desde que era niño y que me ha ayudado con sus consejos y permanente apoyo

Al Dr. Carceller que me ha escuchado hablar de este asunto muchas veces y me ha dado buenos consejos para las publicaciones

A Massimo Garriboli, Carmen Soto y Gabriela Germani que operaron muchas ovejas cuando me hice daño en una pierna y andaba en muletas

A Paco que hizo en una oveja el primer procedimiento fetoscópico de nuestro hospital

A Fernando de Miguel, al que admiro enormemente, por ser tan accesible siendo tan sabio

A Diana Farmer y Doug Miniati, cirujanos pediátricos de San Francisco, que me trataron como a un compañero cirujano respetable siendo un pobre fellow de investigación en un país extranjero

A Eric Jelin y Elizabeth Gress de San Francisco que ayudaron cada día

Al Dr. Sam Pleasure, también de San Francisco, que me ayudó mucho a entender los resultados del modelo quirúrgico

A Deborah Hall que me dio soporte y amabilidad estando solo y lejos

A Mijo Watanabe de Filadelfia (ahora Cincinnati) que nos enseñó a depurar el modelo de rata

Al mismísimo Michael Harrison con el que tuve la suerte de compartir tiempo y me inspiró (como a todos los que le han conocido) en un intento de parecerme a él en algo

A Miguel Ángel García Cabezas, patólogo y compañero de la facultad, que me enseñó que en estos asuntos si uno deja de ser riguroso un momento, todo lo que haces después no vale para nada

A Irene Lara, patóloga por su esfuerzo y rigor

A Rob Kellar y a Carol Fox Warren que me han ayudado en todos los textos en inglés y en las presentaciones de congresos

A todos mis compañeros obstetras de La Paz que me han tratado tan bien desde el principio

Y finalmente, a Manolo Gámez al que se le aplica casi todo lo que he dicho de de los anteriores pero todos los días

A mi padre,

Que una vez no quiso ponerse él en una multa mía con puntos

Fuera de aquello, no recuerdo una ocasión en la que ayudarme, a mí o
a mi hermano, no haya sido su única prioridad

ABREVIATURAS

DTN:	Defectos del tubo neural
MMC:	Mielomeningocele
SNC:	Sistema nervioso central
ACII:	Malformación de Arnold-Chiari tipo II
LCR:	Líquido cefalorraquídeo
ILE:	Interrupción legal de la gestación
AFP:	Alfafetoproteína
RM:	Resonancia Magnética
TAC:	Tomografía axial computerizada
DVP:	Derivación ventrículo peritoneal
GFAP:	Proteína acídica gliofibrilar
HULP:	Hospital Infantil La Paz
AR:	Ácido retinoico
HE:	Hematoxilina-eosina
UCSF:	Universidad de California. San Francisco

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	25
1. CONCEPTO DE MIELOMENINGOCELE	25
2. EMBRIOLOGÍA	26
3. INCIDENCIA	27
4. ETIOLOGÍA	28
4.1. Factores medioambientales	28
4.2. Factores genéticos	29
5. DIAGNÓSTICO PRENATAL	29
5.1. Screening	29
5.2. Diagnóstico: Resonancia Magnética Nuclear (RM)	32
6. SEGUIMIENTO DURANTE LA GESTACIÓN	32
6.1. ILE	32
6.2. Número de ecografías durante la gestación	33
6.3. Recurrencia	33
7. FISIOPATOLOGÍA DE LA MALFORMACIÓN	33
7.1. El neonato	33
7.2. Anatomía de la lesión	34
7.3. Déficits neurológicos	34
7.4. Médula espinal	35
7.5. Tronco cerebral	35
7.6. Hidrocefalia	36

8. TRATAMIENTO	37
8.1. Vía del parto	37
8.2. Tratamiento del neonato	37
8.2.1. Hidrocefalia	38
8.2.2. ACII	39
8.2.3. Alteraciones cognitivas	40
9. VÍAS PARA ESTUDIAR LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DEL TRATAMIENTO PRENATAL	40
10. ALTERACIONES COGNITIVAS EN EL MMC. MALFORMACIONES DESCRITAS EN MODELOS ANIMALES	41
11. TEORÍAS FISIOPATOLÓGICAS SOBRE LA LESIÓN PROGRESIVA DEL TEJIDO NEURAL EN EL MMC Y CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS BÁSICOS EN LA LESIÓN MEDULAR	43
12. RIESGOS MATERNOS DURANTE LA CIRUGÍA FETAL Y LA NECESIDAD DE EXPLORAR ABORDAJES ENDOSCÓPICOS	44
13. BREVE HISTORIA DEL TRATAMIENTO PRENATAL DEL MIELOMENINGOCELE E INTRODUCCIÓN A LA SITUACIÓN ACTUAL DEL PROBLEMA EN LA CLÍNICA	45
14. MODELOS ANIMALES FETALES	51
Oveja (modelo quirúrgico)	51
Rata (modelo teratogénico)	51
II. HIPÓTESIS	55
1. HIPÓTESIS	55
1.1. Hipótesis conceptual	55
1.2. Hipótesis operativa	55
1.3. Hipótesis estadística	56
III. OBJETIVOS	59

IV. MATERIAL Y MÉTODOS	63
1. MODELO QUIRÚRGICO (OVEJA) EN EL ESTUDIO DEL CEREBRO	63
2. MODELO QUIRÚRGICO (OVEJA) EN EL ESTUDIO DE MATRICES UTILIZABLES EN EL DEFECTO LUMBAR	68
3. MODELO TERATOGENICO (RATA) EN EL ESTUDIO DEL DEFECTO LUMBAR	70
4. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS	71
5. LEGISLACIÓN	71
V. RESULTADOS	75
1. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES EN EL DESARROLLO CORTICAL CEREBRAL EN EL MODELO QUIRÚRGICO	75
1.1. Malformaciones cerebrales. Descripción anatómica de la corteza cerebral del animal	76
1.1.1. Animales normales	76
1.1.2. Animales no corregidos prenatalmente sin cierre espontáneo (4 animales del grupo A)	78
1.1.3. Cirugía fetal abierta, cobertura con pegamento y cierre espontáneo (grupos B y C y 5 animales del grupo A)	80
1.2. Peso de los cerebros	81
1.3. Hidrocefalia	81
1.4. Anomalías en el plegamiento cerebral y otras anomalías histológicas encontradas	81
1.5. Anexo 1 en el estudio del desarrollo cerebral del modelo quirúrgico	83
1.6. Anexo 2 en el estudio del desarrollo cerebral del modelo quirúrgico	84
1.7. Técnicas fetoscópicas en la cobertura del defecto lumbar	85
2. ESTUDIO DEL DEFECTO LUMBAR EN EL MODELO QUIRÚRGICO UTILIZANDO MATRICES	85

2.1. Descripción macroscópica	86
2.2. Descripción microscópica	86
3. ESTUDIO DEL DEFECTO LUMBAR EN EL MODELO TERATOGÉNICO	87
3.1. Análisis histopatológico	88
3.2. Estudio del daño en el tejido neural expuesto a medida que avanza la gestación.....	89
3.2.1. Cuantificación del daño neural	90
3.2.2. Estudio de la reactividad de la microglía en las regiones expuestas	92
3.2.3. Descripción de la respuesta local a la colocación de matrices en el modelo teratogénico	93
VI. DISCUSIÓN	97
1. PATRONES DE PLEGAMIENTO CORTICAL EN EL PACIENTE HUMANO CON MMC Y HALLAZGOS EN EL MODELO QUIRÚRGICO	98
2. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO QUIRÚRGICO Y DE SUS SEMEJANZAS CEREBRALES CON LA ENFERMEDAD HUMANA	98
3. POSIBLES MECANISMOS DE ALTERACIONES EN EL DESARROLLO CORTICAL EN EL MODELO	100
4. POSIBLES MECANISMOS DE HIDROCEFALIA EN EL MODELO Y SU PAPEL EN LOS HALLAZGOS CORTICALES.....	101
5. MEJORÍAS NEUROCOGNITIVAS ALCANZADAS EN EL HUMANO MEDIANTE LA COBERTURA PRENATAL DEL DEFECTO LUMBAR	102
6. TÉCNICAS FETOSCÓPICAS ACTUALES UTILIZADAS EN HUMANOS FRENTE A LAS USADAS EN EL MODELO QUIRÚRGICO	103
7. UTILIZACIÓN DE MEMBRANAS O MATRICES EN LA COBERTURA DEL DEFECTO LUMBAR EN EL MODELO QUIRÚRGICO	104
8. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR EL EFECTO DEL CIERRE PRENATAL EN CUANTO A MOTILIDAD DE LAS EXTREMIDADES INFERIORES Y CONTINENCIA.....	105

9. CAMBIOS ESTRUCTURALES Y ESCALAS DE LESIÓN MEDULAR EN LA PLACA NEURAL Y REGIONES TORÁCICAS DEL MODELO TERATOGENICO.....	106
10. EL PAPEL DE LA MIGROGLÍA EN EL DAÑO FETAL DEL TEJIDO NEURAL EXPUESTO EN EL MODELO TERATOGENICO	108
11. LIMITACIONES DE NUESTRO TRABAJO.....	109
Modelo de oveja.....	110
Modelo de rata.....	110
12. FUTURO DE LAS TÉCNICAS DE COBERTURA PRENATAL DEL MMC EN HUMANOS Y EN QUE SENTIDO PUEDEN SER INTERESANTES LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS	111
VII. CONCLUSIONES.....	115
CONCLUSIONES PRINCIPALES.....	115
CONCLUSIÓN SECUNDARIA.....	115
VIII. RESUMEN	119
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	119
MATERIAL Y MÉTODOS	119
RESULTADOS	119
CONCLUSIONES.....	120
IX. BIBLIOGRAFÍA	123

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTO DE MIELOMENINGOCELE

Los defectos del tubo neural (DTN) son malformaciones congénitas frecuentes asociadas a enormes y variados tipos de déficits. El mielomeningocele (MMC) es el tipo más frecuente de DTN.

El MMC es un defecto en la columna vertebral y en la piel en el que las meninges y el tejido neural de la médula espinal se encuentran expuestos [1].



Figura 1. MMC en neonato a término (Hospital La Paz).

Al encontrarse expuesto el tejido neural, la malformación se conoce también como *disrafismo espinal abierto*, a diferencia de los *disrafismos ocultos*, en los que el defecto óseo existe pero no el cutáneo, de manera que el tejido neural no se encuentra expuesto. Este trabajo tratará únicamente sobre el MMC.

2. EMBRIOLOGÍA

El sistema nervioso central (SNC) inicialmente tiene un aspecto plano, se encuentra formado por ectodermo y es denominado placa neural (3.^a semana de gestación). Los aspectos laterales de esta placa se elevan y aproximan entre sí hasta fusionarse inicialmente en la región cervical. Este proceso continúa posteriormente en direcciones cefálica y caudal [2].

El cierre craneal ocurre el día 25 de gestación (fig. 2), mientras que la fusión del extremo caudal se retrasa 2 días [3]. Este proceso se llama *neurulación* y forma el SNC; el MMC está causado por un defecto en este proceso [4,5].

El cierre del *neurocele* (el canal central del SNC en la etapa embrionaria) aísla las vesículas craneales, evitando así que se vacíen y manteniendo un estado de distensión necesario para el correcto desarrollo del cráneo y el cerebro [6].

El fallo del cierre hace que las vesículas se colapsen, siendo éste uno de los mecanismos propuestos en el desarrollo de la malformación de Arnold-Chiari (ACII) [7]. En esta malformación, la reducción marcada del volumen intracraneal da lugar a una fosa posterior pequeña de manera que el cerebelo es empujado hacia regiones caudales (*foramen magnum* y canal espinal superior).

Esta malformación típicamente produce una obstrucción en la salida de líquido cefalorraquídeo (LCR) a través de la fosa posterior, produciendo así hidrocefalia. Casi todos los pacientes con MMC tienen ACII y la mayoría de ellos asocian también hidrocefalia [8].

Estas anomalías tienen gran importancia en el desarrollo del cerebro, por lo que las manifestaciones clínicas del MMC son distintas a las de las lesiones espinales traumáticas.

Por lo tanto, además de los defectos motores o sensitivos, el MMC asocia defectos cognitivos y de atención, así como tendencia a la apnea y estridor y, por supuesto, mayor mortalidad relacionada directamente con estos aspectos de la malformación [9].

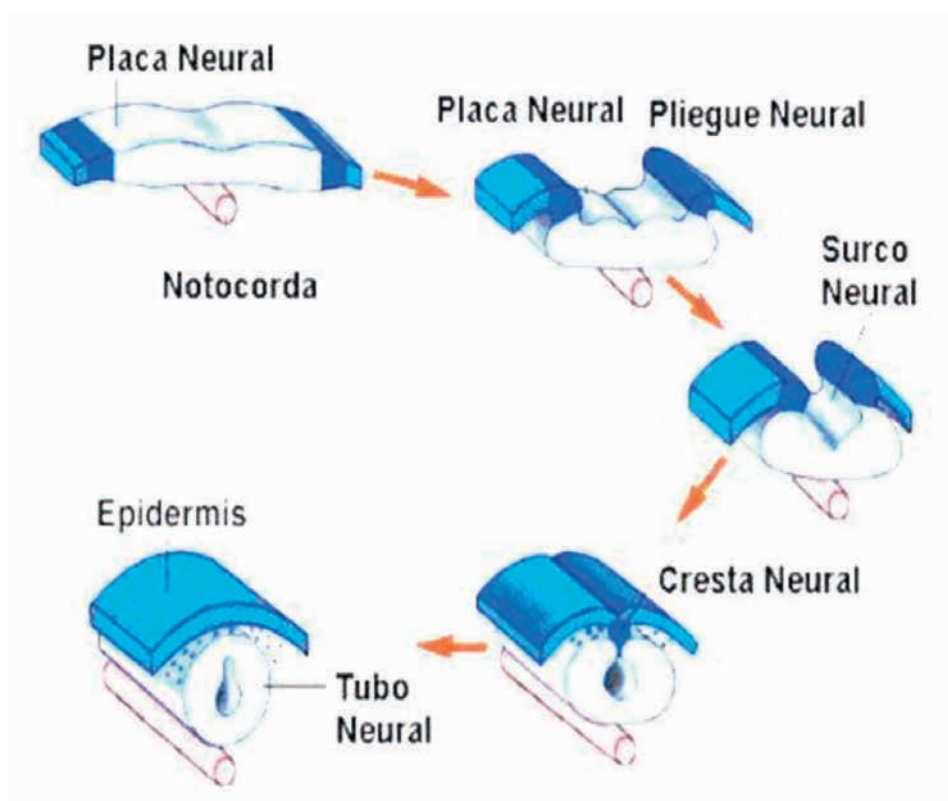


Figura 2. Histología y organogénesis. Tecnología Médica 2012. Sanhueza M.

3. INCIDENCIA

La incidencia de los DTN (en los que el MMC es el más frecuente) es muy variable y depende de aspectos étnicos, geográficos y nutricionales [10]. Generalmente varía entre menos de 1 a 7 por 1.000 nacidos vivos. Las tasas más altas se describen en China, Irlanda, Gran Bretaña, Paquistán, India y Egipto. Las niñas lo padecen más frecuentemente que los niños [10,11]. En EEUU, si una mujer tiene un niño con un MMC, el riesgo de tener otro niño con el mismo problema es de 2,5% (20 veces mayor que en la población general) [12].

La frecuencia de nacidos con el problema ha disminuido en los últimos años gracias a la monitorización sérica de alfafetoproteína en la madre, la administración preconcepcional de ácido fólico y mejoras en la dieta [13].

4. ETIOLOGÍA

La mayor parte de los MMC son malformaciones aisladas con un origen multifactorial. Algunos DTN pueden aparecer formando parte de síndromes o asociados a cromosomopatías (*Meckel-Gruber*, *Roberts*, *Jarcho-Levin*, *HARD*, o trisomías 13 o 18) [14].

4.1. Factores medioambientales

1) Deficiencia de folato:

1a) Estudios prospectivos randomizados han descrito que la administración de suplementos de ácido fólico reduce de manera significativa el desarrollo de DTN [15].

1b) El folato sérico es menor en mujeres con gestaciones afectadas por DTN. Estas pacientes presentan también concentraciones elevadas de homocisteína y ácido metilmandélico y concentraciones reducidas de vitamina B12 [16,17].

1c) Se ha descrito también el desarrollo de anticuerpos anti receptores de folato como causa de desarrollo de DTN. Sin embargo este punto se encuentra peor descrito que los anteriores [18].

2) Administración de ácido valpróico o antagonistas del ácido fólico: Carbamacepina, Fenobarbital, Fenitonia, Primidona, Sulfasalacina o Trimetoprim [19].

3) Diabetes mellitus como causa de hipoxia y embriopatías [20].

4) Obesidad como causa de aporte insuficiente de ácido fólico.

5) Hipertermia en primer trimestre por mecanismos desconocidos.

6) Bridas amnióticas como causa de interrupción de cualquier parte del feto.

7) **Otras drogas** durante el embarazo como el Clomifeno, con asociación peor descrita por el escaso número de casos [21].

4.2. Factores genéticos

La sospecha de factores genéticos se fundamenta en la mayor asociación de la malformación en gemelos monocigóticos y familiares de primer grado, y por su mayor frecuencia en niñas que en niños [22].

1) **Polimorfismos MTHFR**. Gen que codifica uno de los enzimas que regula los niveles de folato y homocisteína. MTHFR tiene una variante genética común que tiene una actividad catalítica reducida. Los pacientes homocigotos o heterocigotos de esta variante tienen niveles disminuidos de folato, siendo el riesgo de DTN mayor en homocigotos [23].

2) **Polimorfismos MTHFD1**. Gen que codifica una proteína con tres actividades enzimáticas con papeles importantes en el metabolismo del ácido fólico. Mediante mecanismos peor conocidos, las variantes de este gen se asocian con el desarrollo de DTN no relacionado con las concentraciones séricas de folato [24].

5. DIAGNÓSTICO PRENATAL

5.1. Screening

Los métodos de *screening* son dos: la monitorización sérica de AFP y la ecografía, que actúa como método diagnóstico y de *screening*.

1) **Candidatas**. Los DTN, en el 90-95% de los casos, ocurren en gestaciones sin ningún factor de riesgo, de manera que el *screening* basado únicamente en estos factores suele ser poco útil. Todas las mujeres gestantes deben ser candidatas a métodos de *screening* de DTN [25].

2) Riesgos y beneficios. Los DTN tienen una elevada mortalidad y morbilidad. La anencefalia es generalmente letal *in útero* o tras pocas horas del nacimiento; el encefalocele es generalmente letal o asocia terribles defectos cognitivos y neurológicos. En el MMC los defectos neurológicos, motores, sexuales, urológicos y óseos dependen del nivel de la lesión.

Beneficios del *screening*: permite a las parejas decidir sobre la interrupción legal de la gestación (ILE), o en caso de seguir adelante, les da la oportunidad de prepararse para el nacimiento de un niño afectado y plantear la posibilidad de procedimientos prenatales [26].

Riesgos: la ansiedad relacionada con los resultados positivos y el parto pretérmino relacionado con los procedimientos diagnósticos que se indican después como la amniocentesis [27].

3) Ecografía (diagnóstico y *screening*). El resultado depende en parte de la localización del defecto, de la posición del feto, del volumen de líquido amniótico, del peso y talla maternas (la obesidad disminuye la capacidad de detección) y de la experiencia y equipamiento del ecografista [28,29].

Los estudios transvaginales en el tercer trimestre describen tasas de detección para el MMC del 44%. Los estudios en el segundo trimestre aumentan las posibilidades de detección al 92-95%.

Cerca de la semana 12 o 14 pueden identificarse defectos óseos o una lesión que abulta en el contorno posterior de la espalda. Posteriormente a esta fecha se identifican dos signos: el del «limón», relacionado con aplanamientos laterales y frontales del cráneo (flechas rojas), y el de la «banana», relacionado con la convexidad posterior del cerebelo (flechas amarillas) (fig. 3). Ambos signos se relacionan con la malformación de ACII.

Es posible describir también ventriculomegalia o microcefalia [30].

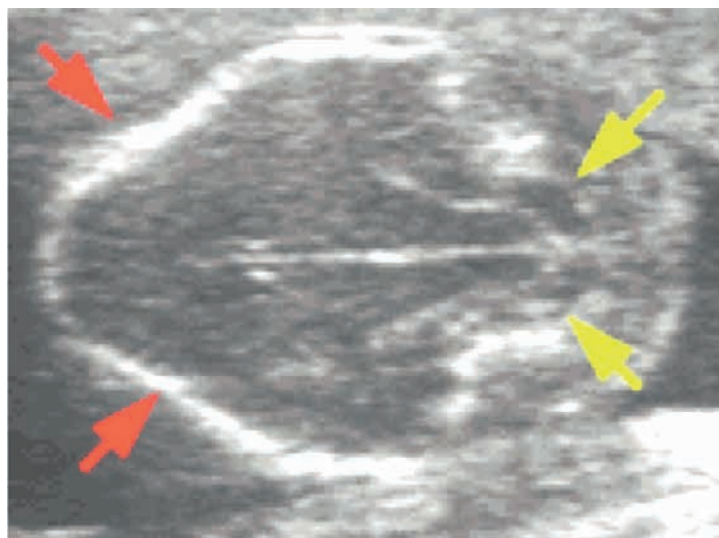


Figura 3. Eco craneal en MMC (HULP).

4) Alfetoproteína (AFP). Se trata de una proteína fetal de función desconocida que se sintetiza en distintas partes del organismo. Probablemente sea una proteína relacionada con la inmunorregulación o una proteína de transporte [31].

La AFP puede medirse en suero materno, líquido amniótico o plasma fetal. La concentración en suero materno es muy inferior a la del líquido amniótico o el suero fetal. Aumenta durante los estadios iniciales de la gestación, alcanza un pico cerca de la semana 28, y seguidamente cae.

Un metaanálisis del año 2009, que incluía 684.112 mujeres gestantes en el segundo trimestre, calculó una sensibilidad y especificidad del 75,1 y el 97,7%, respectivamente, para la detección de MMC [32]. Si la AFP materna era superior a 2,5 múltiplos de la mediana, el 85% de las gestaciones no gemelares tenían un feto con DTN [33].

Existen distintos factores que pueden modificar la interpretación: edad gestacional, embarazos múltiples, raza, peso materno, diabetes u otras malformaciones también asociadas a elevación de la proteína en suero materno como los defectos de pared abdominal [34-36].

5.2. Diagnóstico: Resonancia Magnética Nuclear (RM)

Aunque la ecografía es sin duda el primer arma diagnóstica, distintas razones (que afectan menos al diagnóstico mediante RM) como la obesidad o el oligohidramnios pueden entorpecer el diagnóstico preciso de una malformación mediante ecografía.

Por otro lado, en distintas series, la RM describió otras malformaciones del SNC no sospechadas mediante ecografía y permitió diagnosticar con precisión el nivel anatómico afectado [37-39].

6. SEGUIMIENTO DURANTE LA GESTACIÓN

6.1. ILE

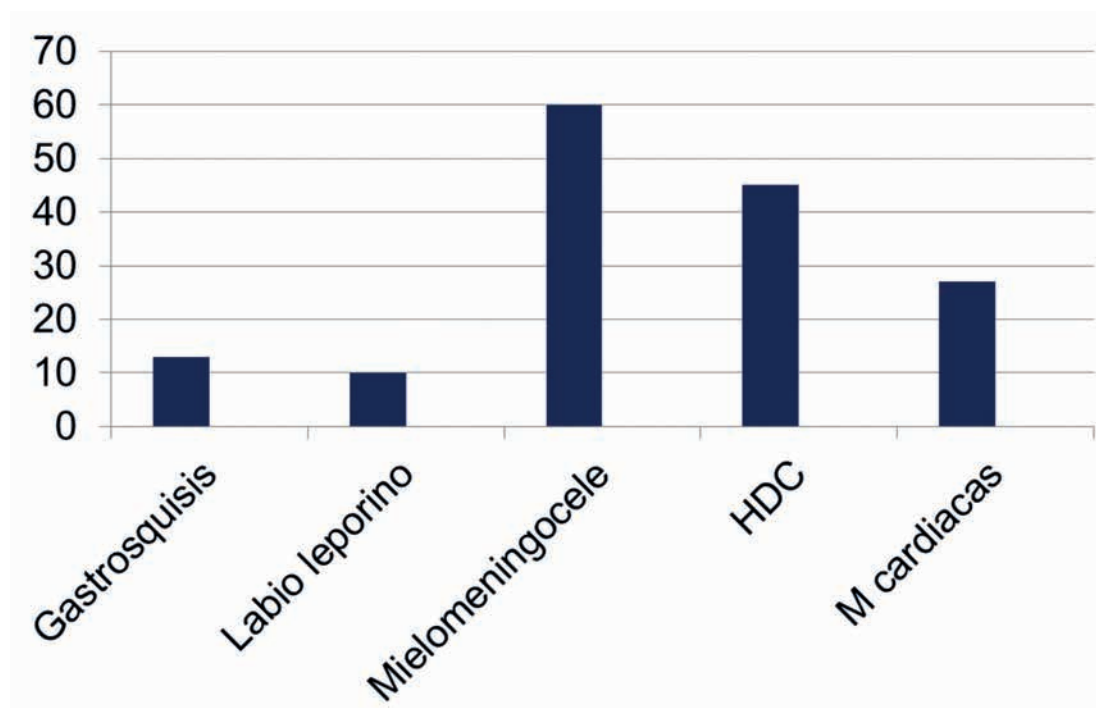


Figura 4. ILE en Canadá y EEUU (1990 y 2000). Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2012. Johnson 2012 [26].

Si se encuentra disponible en el país y en el centro, la terminación electiva del embarazo es una opción. Una revisión sistemática de la literatura del año 2012, que

recogía 17 estudios de Europa, Norteamérica, Sudamérica y Asia, concluyó que la frecuencia de aborto electivo tras el diagnóstico prenatal fue del 83% para la anencefalia (rango 59-100%) y 63% para el MMC (rango 31-97%).

En estudios referentes únicamente a Norteamérica y Canadá, entre los años 1990 y 2000, el MMC fue la malformación en la que con mas frecuencia se tomó esta decisión (fig. 4) [26].

6.2. Número de ecografías durante la gestación

El seguimiento ecográfico proporciona información sobre la hidrocefalia, el tamaño de la cabeza fetal y el segmento afecto, permitiendo informar a los padres y planear el parto. La frecuencia de las exploraciones no está bien definida, pero la mayor parte de los autores sugieren una al mes como un número razonable [27].

6.3. Recurrencia

El riesgo de tener otro hijo afecto con un DTN, teniendo ya uno con el problema, es del 2 al 4%, frecuencia que aumenta al 10% si se tienen ya dos afectos. Las tasas de recidiva son mayores en países donde la malformación es más prevalente [40].

7. FISIOPATOLOGÍA DE LA MALFORMACIÓN

7.1. El neonato

El diagnóstico al nacimiento es generalmente obvio ya que la lesión suele afectar a la región lumbar y sacra en el 80% de los casos, si bien el defecto puede afectar a cualquier parte de la columna.

Al nacimiento la placa neural tiene el aspecto de un saco que protruye y que contiene meninges, LCR y raíces nerviosas bajo el tejido neural displásico [41].

7.2. Anatomía de la lesión

El tejido neural expuesto puede ser plano o encontrarse elevado por LCR. En regiones craneales a la lesión, la médula se encuentra cerrada. En la región cefálica del defecto suele hallarse un pequeño orificio que corresponde a la entrada al canal central. Los nervios motores se encuentran ventrales y mediales. Los nervios sensitivos se encuentran en las regiones laterales de la lesión. En los bordes laterales, la lesión generalmente se encuentra unida a meninges displásicas y a piel (fig. 5) [41].

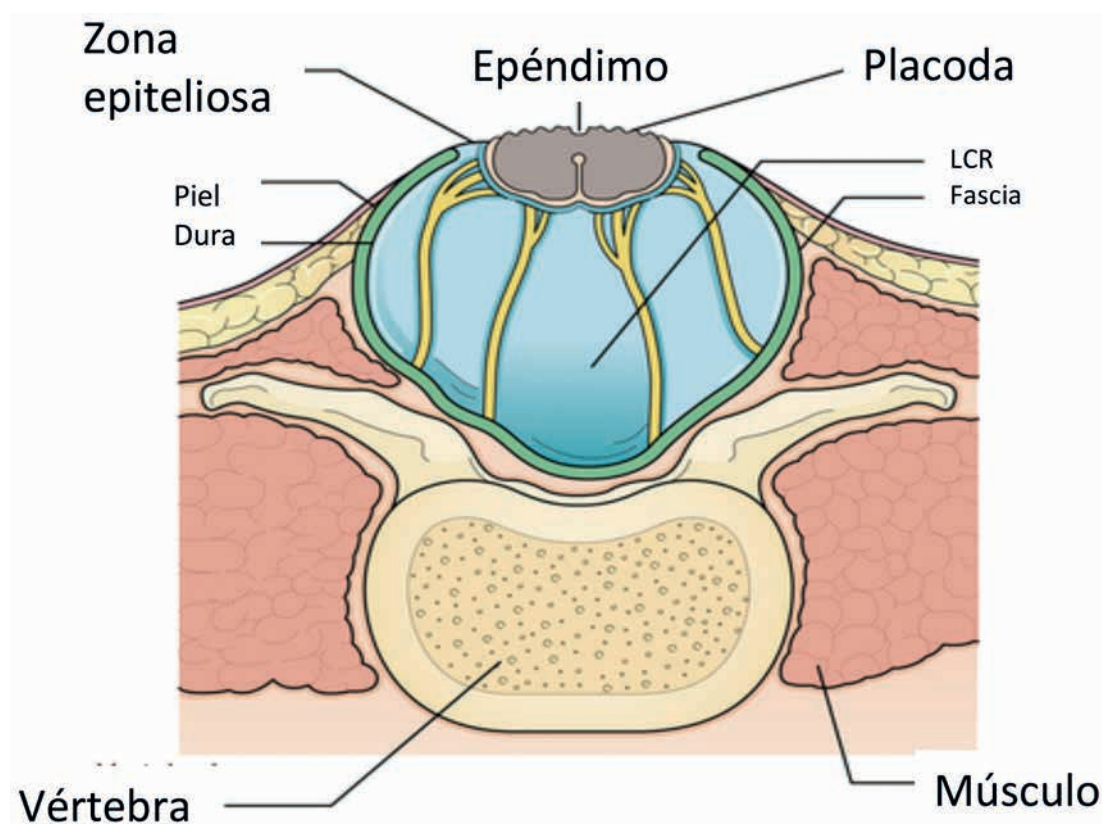


Figura 5. Sección axial del defecto. Clinical Gate. Sutton 2015.

7.3. Déficits neurológicos

En el MMC los problemas neurológicos suelen estar presentes al nacimiento, sin embargo pueden empeorar de manera evolutiva como consecuencia del desarrollo de hidrocefalia o de médula anclada. Establecer inicialmente estos problemas y relacionarlos con el nivel espinal es de gran importancia para conocer su evolución y prevenir su progresión [42].

7.4. Médula espinal

Los defectos neurológicos relacionados con el daño medular generalmente afectan al tronco, las piernas, la vejiga y el intestino. Suelen ser defectos graves en forma de parálisis y déficitis sensitivos. La vejiga y el intestino se encuentran afectados en el 97% de los pacientes, y la clínica suele ser de incontinencia urinaria y fecal o de vejiga neuropática [43].

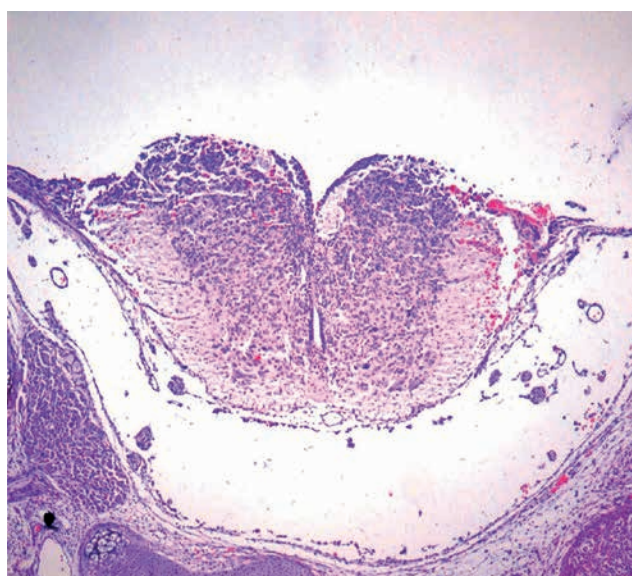


Figura 6. Corte histológico (HE) de región lumbar en MMC en modelo animal.

Algunos segmentos de la médula espinal afectada conservan algunas conexiones con el SNC y tienen una función parcial, produciendo movimientos voluntarios aislados o sensibilidad en determinadas zonas. La tendencia a la espasticidad muscular puede precisar procedimientos quirúrgicos [42].

7.5. Tronco cerebral

Muchos pacientes con MMC presentan disfunciones del tronco relacionadas con la malformación de ACII en forma de dificultad para tragar, paresia de cuerdas vocales, episodios de apnea, estrabismo o debilidad en la musculatura facial. En las formas graves, puede asociarse también a debilidad de las extremidades inferiores [44].



Figura 7. ACII en modelo animal.

7.6. Hidrocefalia

El 90% de los pacientes con MMC presentan aumento del tamaño de los ventrículos laterales relacionado con la malformación de ACII. El riesgo de desarrollar hidrocefalia en los pacientes con defectos sacros es más pequeño que en los que presentan



Figura 8. Hidrocefalia en modelo animal de MMC.

lesiones más altas. La hidrocefalia precisa intervenciones quirúrgicas repetidas para la colocación y revisión de válvulas de derivación ventrículo-peritoneal (DVP) y es una causa importante de mortalidad en la malformación [45,46].

8. TRATAMIENTO

8.1. Vía del parto

El parto por cesárea se indica en los casos en los que existe sospecha de desproporción, y aunque no existen criterios rígidos, pueden ser orientativos los siguientes datos: circunferencia cefálica mayor de 40 cm y diámetro biparietal mayor de 12 cm.

Un estudio retrospectivo que comparó 47 niños con el diagnóstico prenatal de MMC aislado nacidos mediante cesárea programada con 113 pacientes históricos con MMC con diagnóstico postnatal y parto vaginal, llegó a la conclusión de que el nivel de afectación fue dos niveles mejor en los pacientes que nacieron por cesárea. Sin embargo, por el diseño del estudio, es posible que diversas actuaciones en la sala de partos o intervenciones quirúrgicas mejoradas modificaran a mejor el pronóstico final de los niños con diagnóstico prenatal [47].

Actualmente, no hay ningún estudio que de manera sólida demuestre ventajas en una vía u otra. Si no existe desproporción por hidrocefalia, la vía vaginal es aceptable y se trata básicamente de una decisión obstétrica.

8.2. Tratamiento del neonato

Inmediatamente tras el parto la lesión debe ser explorada para conocer su localización, aspecto y observar si existe salida de LCR. Se deben usar guantes sin látex, y el defecto debe ser cubierto con una gasa con suero salino, si bien también están descritas cubiertas plásticas para minimizar la pérdida de calor. La posición del neonato debe evitar presiones prolongadas sobre la lesión [48].

La exploración del neonato debe incluir:

- 1) Observación de actividad espontánea.
- 2) Reflejos tendinosos.
- 3) Estado neurológico según el nivel de afectación.
- 4) Signos de hidrocefalia y de ACII, mediante clínica y exploraciones radiológicas.
- 5) Cifosis y contracturas en extensión o flexión de las extremidades [42]

El tratamiento inicial incluye la administración de un antibiótico de amplio espectro que disminuya los riesgos de infección del SNC. Existe evidencia de reducción en la incidencia de ventriculitis (1% vs 19%) si se administra un antibiótico profiláctico en pacientes en los que el cierre se realiza tras 48h del nacimiento [49].

El cierre quirúrgico debe hacerse generalmente antes de las 72 h de vida. La técnica habitual suele incluir la aproximación de los aspectos laterales de la placa neural para crear un tubo neural. El defecto quedará cubierto con una capa dura y una de piel. Las complicaciones de este procedimiento incluyen: fuga de LCR, infección y quistes de inclusión [42,50].

8.2.1. Hidrocefalia

Tras el cierre del defecto muchos neonatos desarrollan distintos grados de hidrocefalia. El seguimiento de este problema se realiza mediante exploración física y mediante pruebas de imagen: ecografía, RM y tomografía axial computerizada (TAC). La técnica de seguimiento habitual suele ser la ecografía [43].

- 1) Si el neonato se encuentra estable sin clínica de apnea, dificultad para la deglución y buenas respuestas en la exploración neurológica, el paciente debe continuar su seguimiento.

- 2) Sin embargo, un aumento progresivo de la hidrocefalia asociada a inestabilidad, apnea, estridor, vómitos o dificultades para la alimentación debe ser tratado generalmente mediante una derivación ventrículo peritoneal (DVP).

Aproximadamente un 60% de los pacientes necesitarán una DVP a lo largo de su vida. El resto, no asociarán alteraciones en el desarrollo cognitivo por esta razón. En algunos pacientes en los que existe evidencia de una hidrocefalia severa y progresiva muy precoz, es posible la colocación del *shunt* inicialmente durante el cierre del defecto [51,52].

El malfuncionamiento de la DVP puede ser diagnosticado mediante:

- 1) Aumento de tamaño ventricular respecto a las pruebas de neuroimagen anteriores.
- 2) Letargia o edema de papila.
- 3) Cambios en el *shunt* observados en radiología simple.
- 4) Aumento de presión en el LCR.
- 5) Sintomatología de vómitos, letargia o dolor de cabeza persistente.

Las alteraciones en la función del shunt suelen deberse a la obstrucción del catéter de derivación, y el tratamiento es quirúrgico. Los problemas relacionados con la infección deben tratarse mediante antibióticos y ocasionalmente, externalización del catéter [53].

8.2.2. ACII

El número de pacientes que precisan descompresión por clínica relacionada con el ACII es pequeño (5-10%). La clínica en ocasiones es inespecífica y debe diferenciarse de la relacionada con el malfuncionamiento valvular. Los abordajes quirúrgicos son variados: descompresión ósea, apertura de la dura o colocación de métodos de soporte [54].

8.2.3. Alteraciones cognitivas

El MMC puede influir en el desarrollo cognitivo mediante:

- 1) Alteraciones en el desarrollo cerebral relacionadas con el ACII [55].
- 2) Hidrocefalia [55,56].
- 3) Infecciones valvulares [57].

Los pacientes con MMC suelen tener coeficientes de inteligencia normales, si bien muchos de ellos experimentan alteraciones en aprendizaje. Dentro de estas se encuentran déficits de atención y ejecución de tareas, y problemas de memoria retrospectiva y prospectiva [58]. Estas dificultades pueden interferir en la maduración de la persona en distintos aspectos y limitar el aprendizaje de habilidades necesarias para la independencia, lo que tiene repercusiones para el resto de la familia [59].

9. VÍAS PARA ESTUDIAR LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DEL TRATAMIENTO PRENATAL

En el cierre prenatal del defecto se describen los siguientes efectos beneficiosos:

- 1) La disminución del daño neural espinal progresivo relacionado con la exposición al líquido amniótico [60].
- 2) La disminución de los efectos perjudiciales de la fuga de LCR sobre el ACII y la hidrocefalia [61] .

Otros problemas evolutivos tratados más tardíamente en estos pacientes son: la médula anclada, los problemas urológicos, la incontinencia fecal y los problemas ortopédicos [62]. Ninguno de ellos será tratado de manera específica en este trabajo al encontrarse todos ellos fuera de sus límites y alejados de nuestros objetivos.

Hablaremos sin embargo en profundidad de:

- 1) Las bases fisiopatológicas de la hidrocefalia, las alteraciones cognitivas y el ACII.
- 2) Las bases fisiopatológicas del daño neuronal espinal prenatal, incluyendo algunos aspectos del daño neural espinal traumático en contextos postnatales.

Para el estudio de cada punto hemos usado un modelo animal distinto:

- 1) En el estudio de las alteraciones cerebrales utilizamos un modelo quirúrgico en un animal grande (oveja). El modelo quirúrgico no reproduce ninguna de las alteraciones genéticas relacionadas con el desarrollo de la malformación, pero sin embargo nos ha permitido estudiar de manera aislada los efectos sobre el desarrollo cerebral de uno de los factores prevenibles mediante cirugía fetal: la pérdida de LCR [63]. Por otro lado, su tamaño nos ha permitido desarrollar algunas técnicas de cobertura prenatal potencialmente aplicables al humano.
- 2) En el estudio de las alteraciones espinales utilizamos el modelo teratogénico en rata. El modelo reproduce muchos de los aspectos de la malformación en humanos siguiendo probablemente vías semejantes [64]. Este modelo nos ha permitido trabajar con un número elevado de animales para estudiar el daño medular y la respuesta de los macrófagos residentes locales del tejido expuesto al líquido amniótico.

10. ALTERACIONES COGNITIVAS EN EL MMC. MALFORMACIONES DESCRITAS EN MODELOS ANIMALES

Las alteraciones cognitivas asociadas al MMC suelen ser la dificultad en el aprendizaje y déficit de memoria; su patogénesis no es bien conocida y es descrita generalmente asociada a hidrocefalia [65].

Existen solo unos pocos estudios que describan profundamente las alteraciones cognitivas del MMC y su asociación con alteraciones en el desarrollo neuronal cere-

bral [66]. Las alteraciones cerebrales descritas en modelos animales son únicamente macroscópicas e inespecíficas [67].

Varios modelos experimentales de hidrocefalia en ratas han descrito déficit motor y de aprendizaje progresivo y proporcional a la severidad de la hidrocefalia; en estos trabajos, el déficit neurológico puede ser evitado o incluso revertido con el establecimiento de una DVP en el periodo postnatal. Las alteraciones morfológicas descritas por estos modelos son básicamente alteraciones corticales en forma de muerte celular y degeneración axonal. Todos ellos se basan en la inyección intraventricular de la sustancia aluminada Kaolín, que produce una respuesta inflamatoria meníngea rápida con obstrucción de la salida del cuarto ventrículo [68,69].

La única referencia existente en el caso del MMC describe, en un modelo de oveja, cierta disminución en la densidad axonal de la fimbria en un número reducido de animales, y sin posibilidad de establecer conclusiones sobre el beneficio en este sentido del cierre prenatal del defecto [67].

El MMC y el estudio de su tratamiento prenatal han sido orientados siempre hacia los beneficios motores o las repercusiones groseras observadas en cerebro y cerebelo.

La existencia en el MMC de déficits cognitivos no verbales orientaría la búsqueda de alteraciones en la sustancia blanca de ambos hemisferios, así como en la integridad del cuerpo calloso. Por otro lado, la relación entre el MMC y el ACII podría orientar, a su vez, la búsqueda hacia aquellas regiones que, por encontrarse cercanas a los ventrículos, tengan mas probabilidades de ser dañadas, y cuya alteración explicaría en parte los trastornos por déficit de atención y memoria a corto y largo plazo descritos en humanos. Por último, el déficit de funciones ejecutivas llevaría a buscar también alteraciones en el desarrollo neuronal en la corteza prefrontal.

El estudio de las alteraciones cerebrales en el desarrollo cortical en el modelo animal de MMC está pendiente. Enriquecer el modelo en este sentido aproximaría los estudios experimentales a la práctica clínica y nos permitiría comprobar de manera completa el beneficio del cierre prenatal del defecto.

11. TEORÍAS FISIOPATOLÓGICAS SOBRE LA LESIÓN PROGRESIVA DEL TEJIDO NEURAL EN EL MMC Y CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS BÁSICOS EN LA LESIÓN MEDULAR

Las primeras observaciones que sugirieron que el daño medular fetal era progresivo, se basaron en la disminución ecográfica de movilidad en extremidades inferiores a lo largo de la gestación [70].

La evidencia en modelos animales describió el deterioro estructural en lesiones tardías y la preservación de tejido en momentos iniciales, sugiriendo incluso que la lesión podría empeorar al existir contacto al final de la gestación con orina y meconio [71].

En humanos, los estudios con microscopia electrónica sobre fetos con MMC muertos en distintos estadios de la gestación, describieron preservación inicial y desestructuración final con áreas de necrosis, vacuolización y hemorragia [61].

Los astrocitos constituyen un elemento funcional crítico en el SNC. En situaciones de daño tisular, los astrocitos experimentan cambios celulares y bioquímicos necesarios para el proceso de reparación.

Sus funciones generales incluyen monitorización del ambiente tisular en busca de patógenos, manteniendo la homeostasis, fagocitosis de células muertas, y respuesta a los cambios del ambiente local modificando su comportamiento mediante interleucinas proinflamatorias y antiinflamatorias [72].

La proteína ácida gliofibrilar (GFAP en inglés) es una proteína estructural de los astrocitos que puede ser un marcador útil para varios tipos de daño cerebral y de médula espinal. Varios estudios experimentales sugieren que la destrucción de la médula espinal expuesta en el MMC se puede evaluar mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-GFAP o por determinación de sus niveles en el líquido amniótico [73,74]. Además, la terapia antiinflamatoria con corticoides ha mostrado efectos beneficiosos en un modelo experimental de MMC mediante un mecanismo inhibitorio sobre astrocitos registrado mediante la disminución de síntesis de GFAP [75].

Durante el desarrollo, un tipo de macrófagos residentes en el SNC, la microglía, elimina células apoptóticas y conexiones neurales inapropiadas, ayudando a definir el SNC maduro. Son muy sensibles a cambios en el SNC [76]. Dependiendo de su estado funcional, la microglía adquiere diferentes formas [77] que pueden ser estudiadas mediante algunas técnicas de inmunohistoquímica (Iba-1) [78,79].

Disponer de métodos de cuantificación del daño tisular en este contexto y conocer el comportamiento de la microglía en el MMC fetal, permitiría establecer algunas bases para conocer la efectividad de distintos tratamientos con los que podría completarse la cobertura prenatal del defecto espinal.

12. RIESGOS MATERNOS DURANTE LA CIRUGÍA FETAL Y LA NECESIDAD DE EXPLORAR ABORDAJES ENDOSCÓPICOS

La morbilidad materna aparece relacionada generalmente con el parto pretérmino y el tratamiento de éste. El efecto secundario más frecuente es el edema agudo de pulmón tras el tratamiento con fármacos tocolíticos, siendo el efecto del fármaco reversible, generalmente, con tratamiento adecuado en una unidad de cuidados intensivos. Este tipo de complicaciones son mucho menos frecuentes en procedimientos fetoscópicos que en cirugía fetal abierta; de hecho ha sido descrita la necesidad de tratamiento tocolítico únicamente en un 8% de los procedimientos fetoscópicos frente a un 55-60% de los procedimientos mediante cirugía abierta [80].

Existen pocos estudios que describan el impacto de la cirugía fetal sobre la madre; el más extenso en este sentido fue realizado en el año 2004 por cirujanos del Hospital de la Universidad de San Francisco (UCSF). En este estudio se analizó la mortalidad y morbilidad materna según los distintos tipos de intervención. Se llevó a cabo un estudio retrospectivo de 187 intervenciones realizadas entre julio de 1989 y mayo del 2003; fueron 87 casos de cirugía fetal abierta, 69 con técnicas endoscópicas y 31 con técnicas percutáneas. Los procedimientos endoscópicos, incluso con laparotomía (sin histerotomía), presentaron una morbilidad menor estadísticamente significativa frente a los abiertos, en términos de: cesárea en el parto (58,8% vs 94,8% $p < 0,001$), requiri-

mientos de una unidad de cuidados intensivos (1,4% vs 26,4%, $p<0,001$), estancia en el hospital (7,9 vs 11,9 días, $p<0,05$) y corioamnionitis (2,9% vs 12,6%, $p<0,05$) [81].

El principal problema asociado a la histerotomía es el parto pretérmino y la fisiopatología de esta asociación no es bien conocida. El tratamiento con terbutalina, sulfato de magnesio, indometacina o nifedipino ha sido relativamente ineficaz en el parto pretérmino tras histerotomía comparado con la utilidad de los mismos fármacos en el tratamiento del parto pretérmino sin histerotomía previa. La nitroglicerina i.v. es un potente tocolítico pero, sin embargo, necesita un riguroso control hemodinámico materno y su uso es complejo.

La corioamnionitis es el siguiente problema en frecuencia tras el parto pretérmino. Tanto el parto pretérmino como la corioamnionitis pueden poner en peligro la gestación y la propia vida de la madre; por esta razón, en las referencias recientes existe una tendencia clara hacia las intervenciones fetales orientadas al ámbito puramente endoscópico, reservando la cirugía fetal abierta para casos excepcionales [82].

13. BREVE HISTORIA DEL TRATAMIENTO PRENATAL DEL MIELOMENINGOCELE E INTRODUCCIÓN A LA SITUACIÓN ACTUAL DEL PROBLEMA EN LA CLÍNICA

A mediados de los años 80, un grupo de cirujanos de California, liderados por Michael Harrison, comenzó a plantear la posibilidad de tratar prenatalmente algunas malformaciones congénitas con consecuencias postnatales predecibles. Uno de sus objetivos fue el MMC. La razón principal que argumentaban era la bien descrita disminución ecográfica de movimiento en las extremidades inferiores a medida que la gestación avanza [70]. Siguiendo el planteamiento que tuvieron con todas las malformaciones fetales, desarrollaron un modelo animal en el que probar distintas técnicas de reparación o cobertura prenatal. El animal elegido fue la oveja y durante estos primeros años todos los trabajos giraron en torno a este modelo quirúrgico [63]. A mitad de la gestación actuaban sobre el feto realizando una laminectomía lumbar con exposición de la médula, que seguidamente cubrirían, o no, un mes después. El modelo resultó

un éxito enorme al presentar numerosas similitudes con la enfermedad humana. La médula no tratada recordaba histológicamente a la del MMC en humanos; la disposición de las meninges y del tejido neural expuesto era idéntica y los grados elevados de aplanamiento, fibrosis y gliosis recordaban los de los MMC nacidos a término [60]. La clínica, por supuesto, acompañaba estos hallazgos, y los corderos neonatos eran parapléjicos e incontinentes [63]. El estudio en el modelo del SNC fue también exitoso; los animales no tratados tenían herniación cerebelosa y algunas alteraciones en el desarrollo axonal cerebral [67].

Establecido el modelo, a mediados de los 90 se comenzó a trabajar sobre éste con un cierre prenatal semejante a la cirugía postnatal en humanos: cierre con sutura continua en dos capas, una de dura y otra de piel. El resultado del cierre prenatal fue muy satisfactorio, se recuperaba la funcionalidad de las extremidades inferiores y la histología medular y se evitaba la progresión de la herniación cerebelosa [60].

Los trabajos experimentales de grupos españoles, como los del Hospital Vall d'Hebron y el Clínic, utilizaron inicialmente el modelo fetal de conejo. Estos describían los efectos de la exposición al meconio y el potencial efecto beneficioso de la cobertura prenatal, los corticoides y el parto pretérmino [83,84]. El modelo teratogénico en ratón y rata fue desarrollado principalmente por el Children's Hospital of Philadelphia (CHOP) [85,86]. Este reproduce de manera congénita y fidedigna el defecto lumbar probablemente al interferir en los mecanismos de expresión génica que, aunque no bien conocidos, deben tener similitudes con los de la enfermedad humana. La principal fuerza de este modelo es, por supuesto, el estudio de la etiopatogenia de la malformación; de hecho nos ha mostrado la sorprendente preservación del tejido neural expuesto en estadios muy precoces de la gestación y su deterioro progresivo a medida que ésta avanza. Por lo tanto, la cantidad de evidencia experimental que da protagonismo al daño secundario frente al primario es considerable.

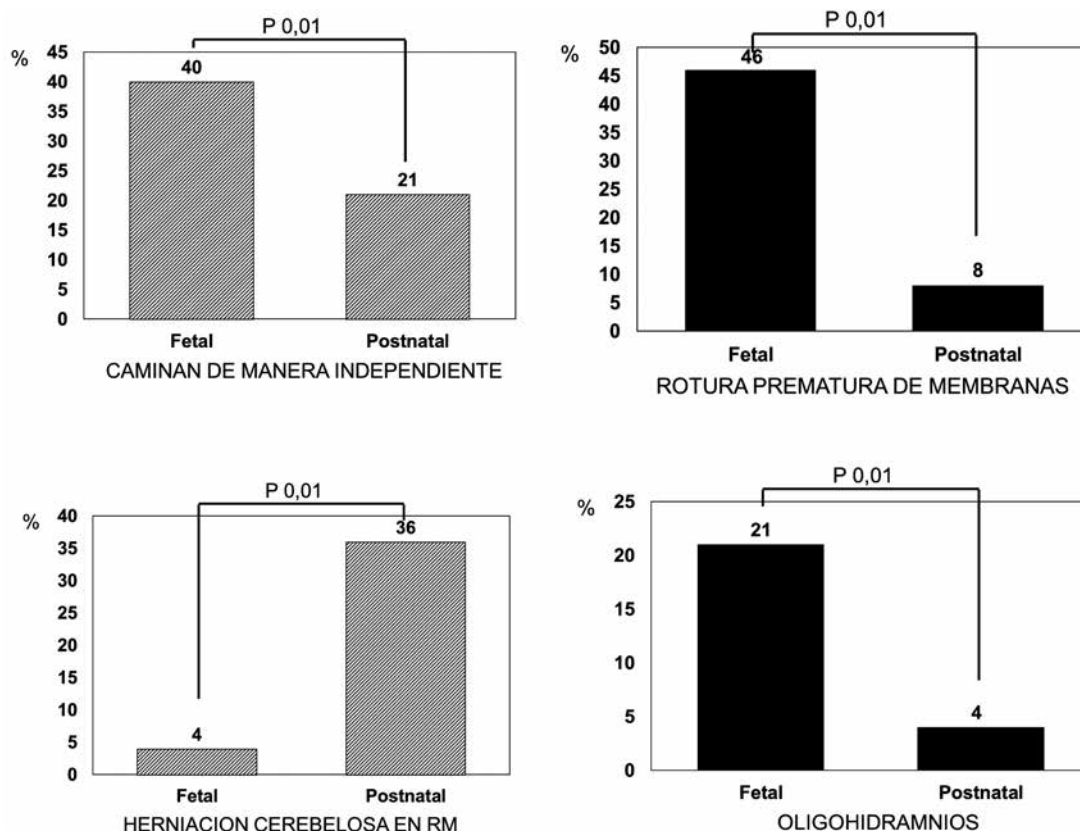
Con una buena parte de esta información disponible a finales de los años 90, Tulipan y Bruner [87,88] del grupo de la Universidad de Vanderbilt y Adzick y Sutton [8] del CHOP describieron los primeros procedimientos en humanos. Los resultados iniciales mejoraron la conformación de cerebro y cerebelo en la RM prenatal y describie-

ron la disminución de la necesidad de colocación de una VDP. Los resultados fueron muy prometedores; sin embargo, los criterios de inclusión cambiaban entre centros y los controles usados eran históricos y, por lo tanto, los resultados, cuestionables.

El tratamiento mediante cirugía fetal abierta de una patología no letal con resultados poco sólidos fue rápidamente puesto en duda. Scott N. Adzick, del grupo de Filadelfia, lideró la creación de un ensayo de gran envergadura que viniera a solventar las dudas que existían sobre un procedimiento que él había desarrollado desde sus orígenes [89]. En el año 2003, con ayuda del Instituto de Salud Americano (NIH), se puso en marcha el MOMS (Management of Myelomeningocele Study). Este estudio, prospectivo y randomizado, se limitó a solo los 3 centros que estaban realizando ese tipo de cirugía fetal abierta en esos momentos, e incluyó a 100 pacientes en la rama del tratamiento prenatal y 100 en la del tratamiento postnatal. Sus objetivos, aunque centrados en el desarrollo cognitivo, la funcionalidad de las extremidades inferiores y la necesidad de colocación de una VDP, incluían también varios objetivos secundarios relacionados con la socialización y la calidad de vida. Durante los últimos años, decenas de personas han trabajado en Filadelfia, San Francisco y Vanderbilt dedicadas en exclusiva al correcto desarrollo del ensayo y al seguimiento de estos pacientes. El camino que han seguido ha sido más largo y complejo que el ideado originalmente. Los problemas de inclusión, principalmente la necesidad de hacer la cirugía entre las semanas 19 y 25, plantearon discrepancias entre los grupos originales que se solucionaron con la salida del estudio de algunos de ellos. En diciembre de 2010, el estudio se detuvo al haberse alcanzado resultados significativamente superiores en la rama del tratamiento prenatal antes de llegar al número 200. Por lo tanto, en el contexto del ensayo clínico, la rama de la cirugía postnatal obligatoria dejaba de ser éticamente aceptable, por lo que a partir de ese momento, los padres debían decidir sobre el tratamiento con sus beneficios y riesgos basándose en los datos disponibles.

Los resultados finales del MOMS fueron descritos e ilustrados ampliamente en febrero del 2011, en el *New England Journal of Medicine* [90]. El tratamiento prenatal había conseguido disminuir de manera significativa la necesidad de colocación de una VDP, mejorar el desarrollo cognitivo y el desarrollo funcional de extremidades inferiores, así como muchos otros objetivos secundarios. Los riesgos para la madre y la

gestación fueron semejantes a los descritos previamente con otras cirugías fetales y se centraron, básicamente, en el parto pretérmino, por oligohidramnios o rotura prematura de membranas.



Figuras 9 a 12. Resultados de deambulación, herniación, rotura prematura y oligohidramnios en el MOMS [90].

La solidez del estudio americano nos obligó a reconocer y ofrecer esta posibilidad terapéutica, pero también a informar a los padres con la cautela obligada sobre un procedimiento beneficioso para el pronóstico de su niño pero que puede no alcanzar sus expectativas de mejoría. En la reunión del grupo internacional de medicina y cirugía fetal (IFMSS) de mayo del 2012, los mismos tres grupos americanos expusieron su MOMS-2; segundo estudio, también financiado por el Instituto de Salud Americano, que seguirá a estos niños hasta los 8 años de vida buscando, entre otras cosas, mejoría en la clínica urológica.

En este sentido ha sido descrita recientemente la mejoría en el grosor del detrusor aunque aún sin mejoría clínica aparente. En un seguimiento de 115 pacientes que par-

ticiparon en el MOMS trial, el tratamiento prenatal describió una reducción no significativa en la necesidad de sondaje intermitente a los 30 meses (38% de cirugía fetal vs 51% en el tratamiento postnatal; R 0,74, 95% CI 0,48-1,12). Estos participantes continúan hoy en seguimiento para conocer efectos a largo plazo de función vesical, sexual y cognitiva [91].

Distintos centros han descrito métodos de cobertura poco invasivos para el feto, basados generalmente en la reparación del defecto mediante un parche fijado al defecto con un sellante quirúrgico biodegradable [92,93]. El futuro de este tratamiento pasa por encontrar una técnica fetoscópica de cobertura prenatal mínimamente invasiva que reduzca la incidencia de parto pretérmino.

Entre el año 2011 y el 2016, grupos de Estados Unidos (Tejas y Cincinnati), Alemania (Giessen y Bonn) [94,95], Brasil (Sao Paulo) [96,97] y España (Barcelona) [98] han comunicado y/o publicado procedimientos fetoscópicos exitosos.

Con distintas modificaciones, todos ellos fueron semejantes al siguiente diagrama:

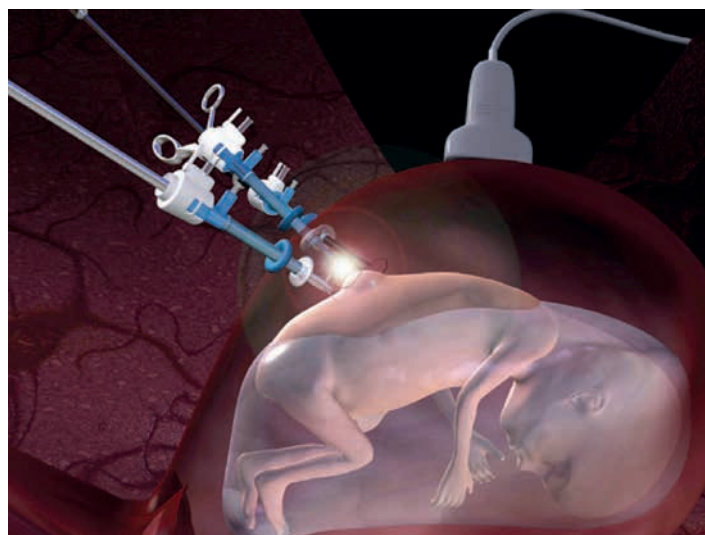


Figura 13. IFMSS 2013. Pedreira.

Guiado por ecografía y con dos o tres trócares y medio gaseoso. Variando en la realización o no de laparotomía, las particularidades y los autores se resumen en el siguiente cuadro:

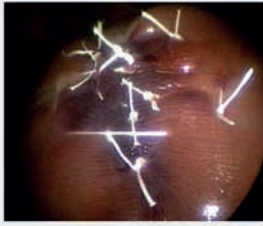
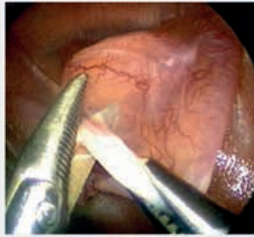

Kohl (Alemania)	Peiró (BCN, Tejas, Cincinnati)	Pedreira (Sao Paulo)
 <ul style="list-style-type: none"> • Disección del defecto y coberturas distintas y complejas (50 pacientes) • Curva de aprendizaje • Resultados similares al MOMS • Menor parto pretérmino 	 <ul style="list-style-type: none"> • Disección del defecto y parche colágeno con pegamento (unos 10 BCN y 13 Tejas) • Buenos resultados motores 	 <ul style="list-style-type: none"> • Disección del defecto y parche celulosa con sutura • Buenos resultados motores y ACII • Beneficios en parto pretérmino

Figura 14. Tabla resumen de procedimientos fetoscópicos.

Los procedimientos fetoscópicos asociarían beneficios semejantes a los de la cirugía abierta, reduciendo los riesgos de sus principales complicaciones. La dificultad extrema de estas técnicas centralizará aún más los casos.

Será difícil hacer descripciones muy superiores a las de la cirugía abierta en resultados y niveles de evidencia [99], sin embargo los procedimientos fetoscópicos ganarán aceptación. Probablemente, prevalecerán las dos técnicas, cada una con sus ventajas e inconvenientes.

A largo plazo, los métodos que disminuyan el grado de fibrosis y gliosis medular tendrán también un papel principal. Este efecto se puede conseguir mediante el uso de fármacos inmunosupresores o de terapia celular con células madre que mejoren el crecimiento neural o que incluso se diferencien hacia glía o tejido óseo, consiguiendo regeneración en lugar de cicatrización. Actualmente, distintos grupos mundiales trabajan en estas líneas de mejora del entorno que favorezca la recuperación del tejido neural [100-103].

14. MODELOS ANIMALES FETALES

Oveja (modelo quirúrgico)

El modelo de oveja fue descrito por primera vez por el cirujano pediátrico Martin Meuli, antiguo alumno de UCSF y del Dr. Harrison. En mitad de la gestación realizó una laparotomía y una histerotomía a una oveja preñada; tras exponer la región lumbar fetal realizó una laminectomía con apertura de la dura hasta la observación de salida de LCR. El modelo fue un enorme éxito al reproducir con gran precisión anatómica la lesión observada en humanos y asociar gran cantidad de la clínica: paraplejía, incontinencia y ACII [63]. No se observaron inicialmente alteraciones en el desarrollo cortical ni hidrocefalia. El modelo quirúrgico no reproduce la etiopatogenia del humano, pero sin embargo, al tener gran tamaño, permitió desarrollar distintas técnicas quirúrgicas potencialmente aplicables en la clínica [60]. Por otro lado, la similitud de los hallazgos encontrados en un modelo que podríamos considerar tosco en la reproducción de la malformación, dio un enorme empuje a la importancia del daño tardío o evolutivo (*second hit*) en el desarrollo del cuadro encontrado en humanos.

Se trata de un modelo costoso desde el punto de vista económico al precisar dos o tres intervenciones sobre la madre, requiriendo supervivencia y siendo escaso el número de animales obtenidos tras mucho esfuerzo.

Rata (modelo teratogénico)

El modelo en rata consiste en la administración de ácido retinoico (AR) a la madre gestante el día 8 (en una gestación de 21 días). De esta manera un número indeterminado de fetos (generalmente más del 50%) nacen con defectos de cierre del tubo neural tipo MMC lumbar. Los mecanismos de actuación del teratógeno no son bien conocidos, pero probablemente deben de tener similitudes con la enfermedad humana. Anatómicamente, la lesión lumbar es exacta y distintos autores han encontrado alteraciones en el desarrollo del troncoencéfalo y de la vejiga [86]. Algunos autores han estudiado también en él alteraciones en la concentración de GFAP en líquido amniótico.

co. Es un modelo muy bueno al proporcionar gran número de especímenes de manera sencilla y barata. Como desventajas, es necesario afinar el momento de administración del teratógeno según la edad gestacional lo que no es sencillo, ya que pequeñas modificaciones horarias pueden influir y no es siempre posible conocer el momento exacto de la fecundación. Otro inconveniente es el tamaño, los procedimientos fetales sobre el defecto han de hacerse cuando el feto tiene un tamaño mínimo (día 17 o 18) lo que es muy tardío en una gestación de 21 días y aun así se encuentran muy limitados por la fragilidad del tejido. Es un modelo excelente para estudiar mecanismos fisiopatológicos de la malformación y experimentar procedimientos fetales sencillos.

II. HIPÓTESIS

II. HIPÓTESIS

1. HIPÓTESIS

1.1. Hipótesis conceptual

1) En el modelo quirúrgico de MMC (oveja) no corregido prenatalmente existen alteraciones en el desarrollo cortical cerebral que podrían explicar las alteraciones cognitivas que observamos en humanos. Estas alteraciones podrían prevenirse mediante métodos de cobertura prenatal abiertos o fetoscópicos potencialmente aplicables en humanos.

2) En el modelo quirúrgico de MMC (oveja) es posible corregir prenatalmente el defecto espinal asociando el uso de matrices utilizables en humanos que, situadas en la región endodimaria, tengan la capacidad teórica de transportar sustancias inmunomoduladoras o promover el crecimiento axonal.

3) En el modelo teratogénico de MMC (rata) es posible cuantificar el daño tisular progresivo del tejido expuesto y la respuesta evolutiva de sus macrófagos residentes locales frente a la lesión.

1.2. Hipótesis operativa

1) En el modelo quirúrgico de MMC (oveja) no corregido prenatalmente se observan alteraciones en el desarrollo cortical mediante técnicas histológicas (Hematoxilina-eosina, HE), descripción de circunvoluciones, hidrocefalia y peso cerebral. Estas alteraciones podrían prevenirse mediante el cierre prenatal del defecto usando técnicas fetoscópicas con pegamento biológico, o cirugía fetal abierta con reconstrucción de la lesión con dos caspas de dura y piel.

2) En el modelo quirúrgico de MMC (oveja) es posible corregir prenatalmente el defecto espinal asociando el uso de matrices biodegradables compuestas por nanofibras. Las matrices podrían ser diseñadas en forma de arco para quedar dispuestas dentro del epéndimo, y cubiertas por una sutura continua de dura sin producir respuesta inflamatoria en el tejido adyacente.

3) En el modelo teratogénico de MMC (rata) es posible cuantificar el daño tisular del tejido expuesto mediante HE y escalas de lesión medular a lo largo de la gestación (E15, 17, 19 y 21) y la respuesta evolutiva de sus macrófagos residentes locales frente a la lesión mediante técnicas inmunohistoquímicas específicas para microglía (iba-1).

1.3. Hipótesis estadística

1) La primera hipótesis nula es que no encontremos en el modelo quirúrgico de MMC (oveja) no corregido prenatalmente las lesiones en el desarrollo cerebral que podrían explicar las alteraciones cognitivas que observamos en humanos. La hipótesis alternativa es que sí las encontremos.

2) La segunda hipótesis nula es que, en el modelo quirúrgico de MMC (oveja), el defecto no pueda ser cubierto usando matrices que queden incorporadas al tejido medular. La hipótesis alternativa es que sí sea posible.

3) La tercera hipótesis nula es que no sea posible cuantificar el desarrollo de la lesión ni la evolución de la microglia en el defecto lumbar del modelo teratogénico (rata), o que, pudiéndose, no hubiera daño medular o este no fuera progresivo. La hipótesis alternativa es que pueda cuantificarse y la evolución sea progresiva a lo largo de la gestación.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

1) Describir en un modelo quirúrgico de MMC en oveja mediante técnicas descriptivas y de histología convencional, alteraciones en el desarrollo cerebral que podrían explicar las alteraciones cognitivas observadas en humanos, así como intentar su prevención mediante técnicas de cirugía fetal aplicables en la clínica.

2) Describir en un modelo quirúrgico de MMC en oveja mediante técnicas de histología convencional la cobertura fetal del defecto lumbar usando matrices que puedan favorecer la regeneración neuronal.

3) Describir en un modelo teratogénico de MMC en rata mediante técnicas de histología convencional (HE y escalas de lesión medular) e inmunohistoquímica (iba1 para microglía), la evolución de la lesión tisular espinal y de la respuesta inflamatoria local.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELO QUIRÚRGICO (OVEJA) EN EL ESTUDIO DEL CEREBRO

Las ovejas preñadas fueron trasladadas a nuestras instalaciones una semana antes de la cirugía con acceso libre a comida y agua hasta las últimas 24 horas previas a la intervención. En todos los casos realizamos un estudio ecográfico que confirmara y datara la gestación mediante diámetros óseos y craneales. Las ovejas fueron intubadas y anestesiadas con Propofol (10 mg/kg) e Isoflurano 2-2,5% CAM con oxígeno a 2 L/min. El dolor postoperatorio fue diagnosticado mediante cambios en el comportamiento y la marcha, y tratado con parches epicutáneos de Fentanilo. La creación del defecto consistió en la realización de una laminectomía lumbar bilateral con apertura de la duramadre seguida de una mielotomía media hasta observar la salida de LCR. La longitud total del defecto fue de unos 3 cm (fig. 15).

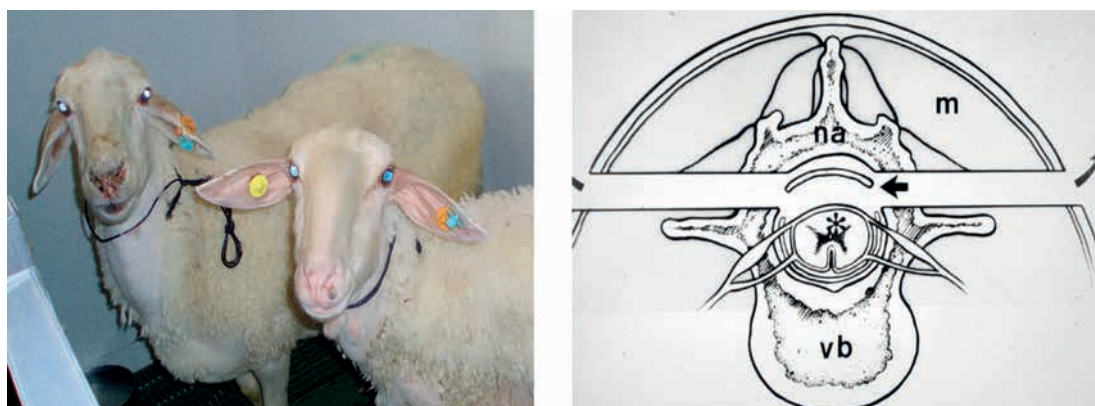


Figura 15. Ovejas en nuestro animalario y esquema del modelo [63].

Realizamos el defecto en 25 animales entre los días 60 y 80 de gestación; en 15 casos (15/25, 60%) éste no fue corregido prenatalmente (grupo A) (fig. 16).

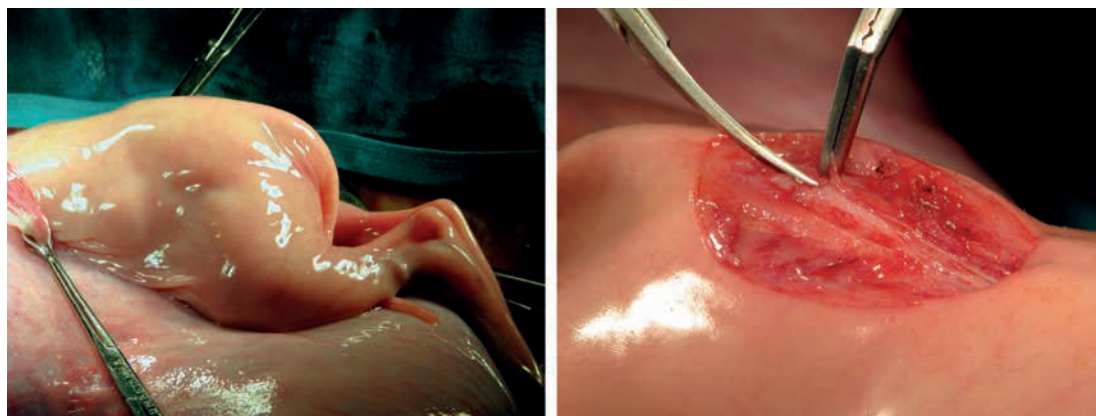


Figura 16. Defecto lumbar.

En 5 (5/25, 20%) el defecto fue corregido mediante cirugía fetal abierta con dos suturas continuas de dura y piel (grupo B) (fig. 17).



Figura 17. Cierre mediante cirugía abierta

En 5 (5/25, 20%) mediante la aplicación abierta de un pegamento biológico (grupo C) [104] (fig. 18).

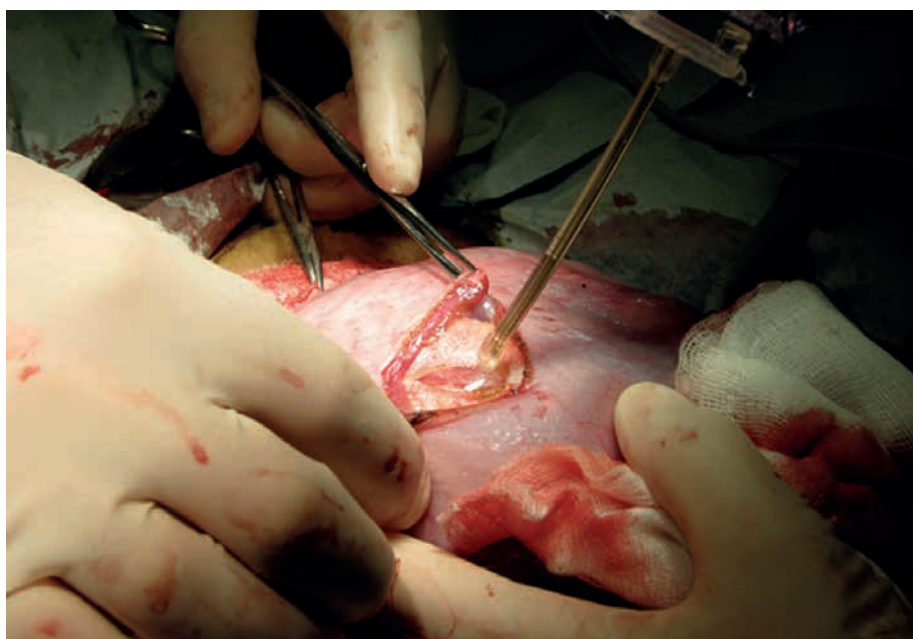


Figura 18. Aplicación abierta del pegamento.

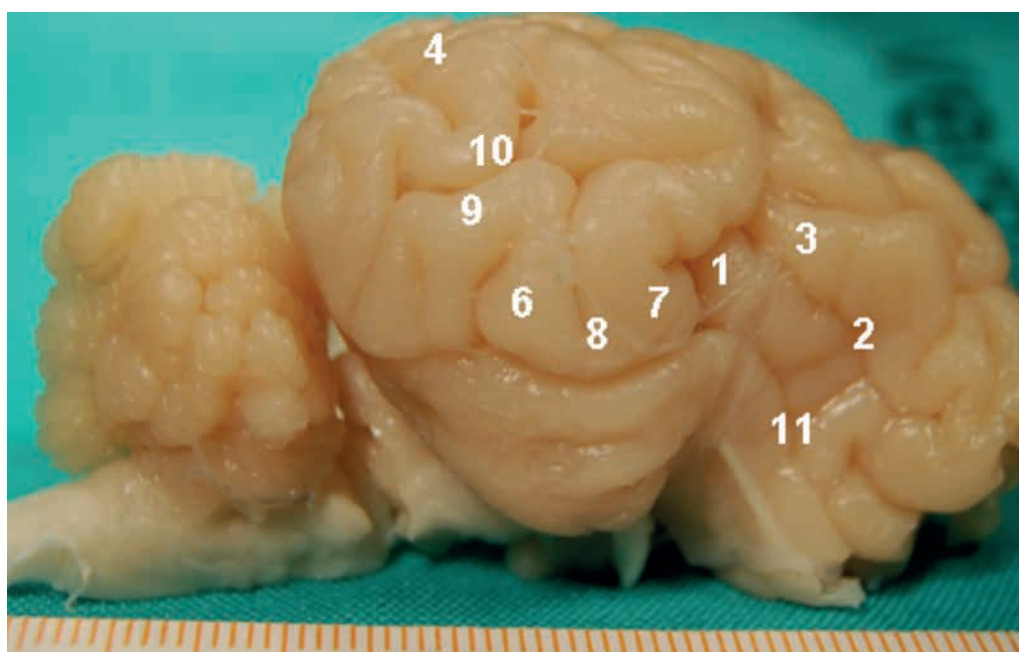
Las gestaciones continuaron hasta el día 140. Los corderos vivieron durante las primeras 24 horas durante las que se estudió la presencia de alteraciones en la marcha y seguidamente fueron sacrificados y perfundidos con Paraformaldehído al 7% y el SNC fue extraído en un bloque cerebro-medula.

Los cráneos fueron explorados externamente y seccionados en su línea media en busca de malformación de ACII, descrita como tejido cerebelar bajo el *foramen magnum* [105].

Los cerebros fueron seccionados en su línea media y se tomaron fotografías de sus planos laterales y sagitales, para posterior estudio de alteraciones groseras en la migración celular e hidrocefalia (cámara Nikon D40x). Los patrones de circunvoluciones fueron divididos en normal, circunvoluciones por debajo en número, aplanadas y engrosadas (*paquigiria*) y circunvoluciones excesivas en número, irregulares de profundidad variable (*polimicrogiria*). La nomenclatura de las circunvoluciones y surcos en el cerebro de la oveja ha sido descrita por varios autores; nosotros elegimos la de Louw [106], por ser la vigente, y por considerar descripciones de otros autores anteriores [107,108].

Tabla 1. Clasificación de Louw

Lateral/Craneal		Medial
1 F Sylvia	11 S Rhinal	21 S Ectogenualis
2 S Presylvius	12 S Marginalis	22 G Genualis
3 G Sylvius rostralis	13 G Marginalis	23 G Ectogenualis
4 S Suprasylvius	14 S Endomarginalis	24 S Endogenualis
5 G Suprasylvius	15 G Endomarginalis	25 S Esplenialis
6 G Obliquus caudalis	16 S Coronalis	26 S Endoesplenialis
7 G Obliquus rostralis	17 G Coronalis	27 G Cinguli
8 S Obliquus	18 S Cruciatius	28 S Corporis Callosi
9 S Ectosylvius	19 G Precruciatius	29 Corporis Callosi
10 G Ectosylvius	20 G Posteruciatius	

**Figura 19.** Clasificación de Louw aplicada a un modelo.

Expresamos los resultados en proporción de estructuras identificables en las fotografías. El hemisferio cerebral izquierdo fue seccionado en cortes coronales de medio centímetro desde la comisura blanca anterior en sentido ventral y dorsal. Los bloques fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes de 6 μ m, que fueron teñidos con HE. Hicimos estudios de histología convencional para describir alteraciones en la migración neuronal, ya que están generalmente asociados a alteraciones en el desarrollo cortical.

Utilizamos también fetos vivos en día 70 para conocer la situación de desarrollo cortical en el momento en que los defectos lumbares fueron creados.

En este apartado hemos de describir también dos métodos particulares de cobertura fetoscópica del defecto semejantes a los utilizados en humanos actualmente. No fueron considerados en los estudios estadísticos ni en los resultados de las malformaciones cerebrales, pero proporcionaron algunas conclusiones. La técnica percutánea con un trocar de aplicación del pegamento (5 animales) no había sido descrita, y se realizó mediante abordaje percutáneo con control ecográfico usando un único trocar Cook (Check-Flo Introducer Set. Cook. RCF 10.0 38-J) compatible con una óptica Storz de 2 mm (11530 AA. Kart Storz). El pegamento sintético usado fue Cosseal® (Baxter) y se introdujo de manera percutánea a través de una aguja de veress con la punta cortada. La técnica percutánea con tres trócares (5 animales) no había sido previamente descrita, y se realizó con puertos de 3mm fijados a la pared con balones de Fogarty introducidos a través de Abocaths paralelos a los puertos. Posteriormente, se suturó un parche ovoideo de Duragen® sobre el defecto usando una sutura monofilamento no absorbible. A continuación los bordes fueron sellados con pegamento biológico, pasando la aguja de veress a través de uno de los trócares, de la misma manera que en el procedimiento fetoscópico de pegamento aislado. En los abordajes fetoscópicos utilizamos Helio conectado a un insuflador de laparoscopia Storz, ya que el uso de CO2 en fetoscopia puede asociarse a acidosis fetal (fig. 20).

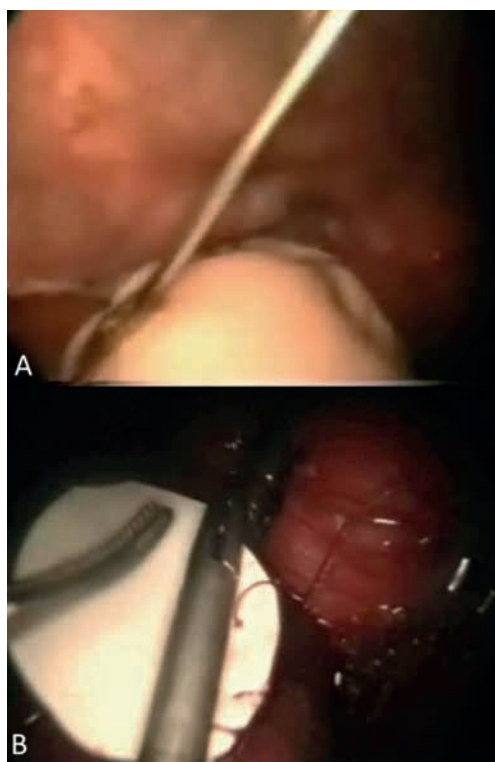


Figura 20. Cobertura fetoscópica con pegamento (A) y con parche (B).

2. MODELO QUIRÚRGICO (OVEJA) EN EL ESTUDIO DE MATRICES UTILIZABLES EN EL DEFECTO LUMBAR

El método de creación del defecto lumbar y control de la gestación fue igual que el descrito en el punto anterior. En este caso, únicamente usamos dos madres y fueron operados dos fetos. En las reparaciones la modificación consistió en lo siguiente: tras realizar la disección de la placa neural, en el lugar del epéndimo se situó una matriz biodegradable de ácido láctico compuesta por nanofibras alineadas (Lactel Absorbed Polymers, Pelma, EEUU). Esta matriz se fabricó con forma de canal para adaptarse a esta región. Tras cerrar la dura, otra lámina del mismo compuesto se situó en las porciones externas fuera de la dura cerrada (figs. 21 y 22).

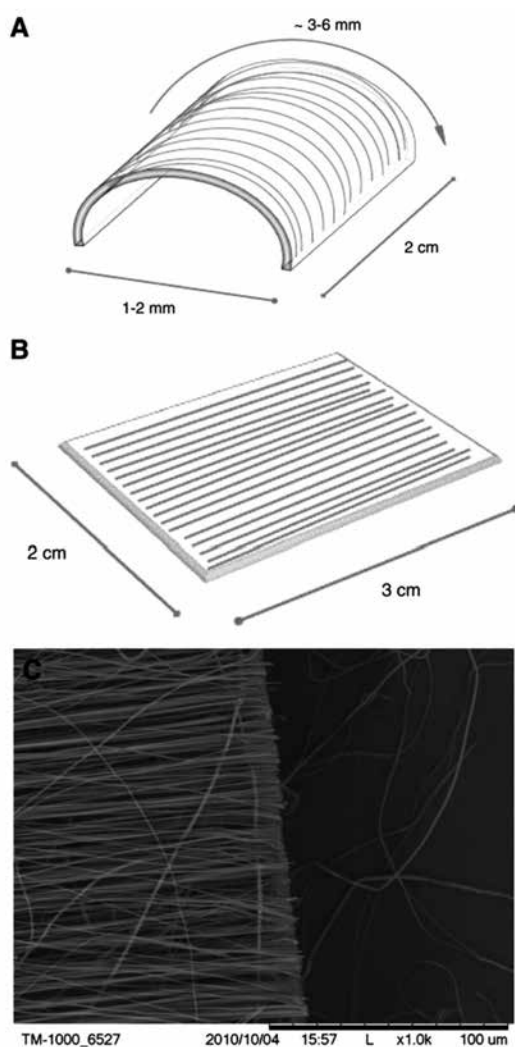


Figura 21. Imagen esquemática del aspecto de las matrices externa e interna e imagen con microscopía electrónica de las fibras alineadas que la constituyen.

La forma de estas fibras fue elegida en este sentido, ya que teóricamente podía actuar como guía al crecimiento axonal ofreciendo una vía que puenteara la zona de cicatriz [109,110].

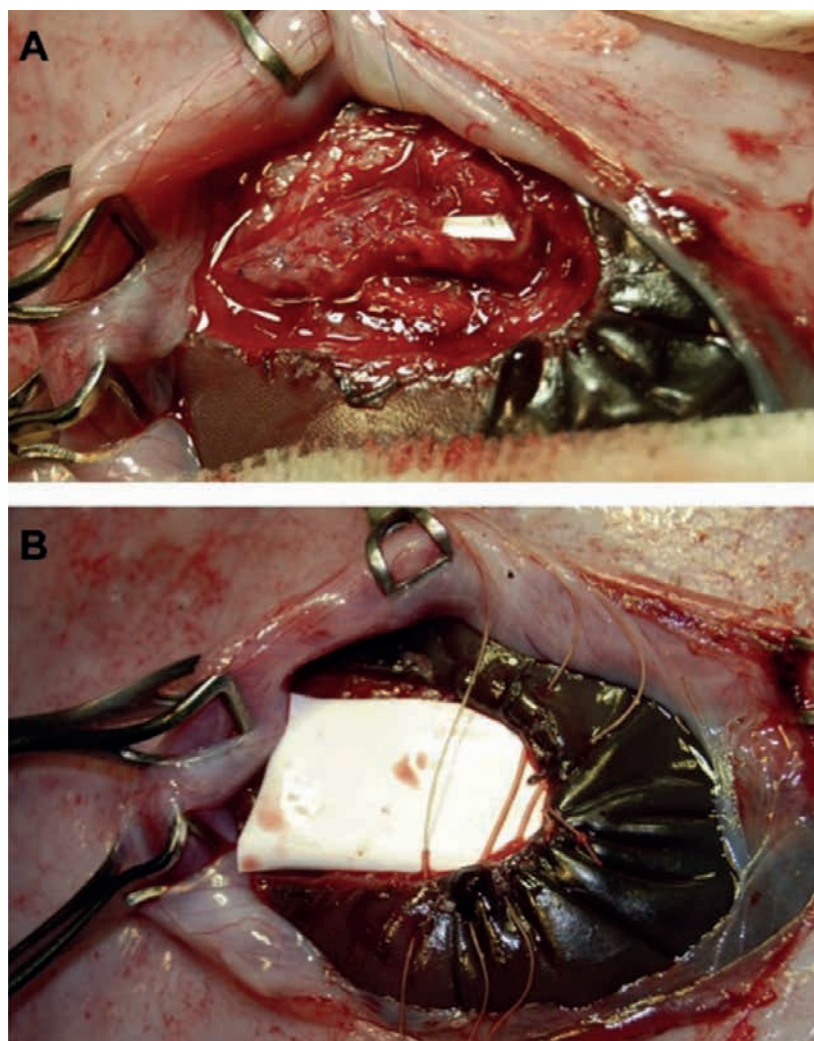


Figura 22. Disposición de las matrices interna (A) y externa (B) situadas prenatalmente sobre el defecto lumbar.

A término, el método de sacrificio animal fue semejante a lo descrito previamente. Los cráneos fueron examinados para comprobar la existencia de herniación cerebelosa [105], y las médulas fueron introducidas en formol 24 horas y criopreservadas. Se obtuvieron secciones de 20 micrómetros que fueron teñidas con HE, ericromo cianina (mielina) y rojo neutro (neuronas).

3. MODELO TERATOGENICO (RATA) EN EL ESTUDIO DEL DEFECTO LUMBAR

Ratas Sprague Dawley con gestación conocida y datada permanecieron en nuestras dependencias con acceso libre a comida y agua al menos 48 antes de las primeras manipulaciones. Las condiciones fueron de 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

El día 10 de gestación (E10), se les administró 100 mg/kg de ácido retinóico (AR, Sigma, Tres Cantos, España); disuelto en aceite de oliva mediante un tubo orogástrico. A los animales controles se les administró la misma cantidad (2 ml) de aceite de oliva. Bajo sedación con sevoflurano (Sevorane, Abbot, Madrid, España) se realizaron cesáreas los días E15, E17, E19 y E 21 y los fetos fueron recolectados. Las madres fueron sacrificadas mediante una inyección intracardiaca de cloruro potásico [85]. Los fetos, 38 controles y 47 MMC, fueron examinados macroscópicamente, fotografiados y seguidamente fueron fijados en formol.

Para el estudio histológico, las regiones torácicas (T9-T10) y lumbares (L2-L3) fueron procesadas por separado y embebidas en parafina. Se hicieron cortes transversales de 5 μ m que fueron teñidos con HE y Nissl para estudiar la estructura medular y neuronal, respectivamente.

El daño histopatológico fue descrito por un patólogo que desconocía el grupo de las muestras que examinaba (I.L.). Las muestras de HE fueron clasificadas utilizando un *score* de lesión medular de 0 a 3 en función de la presencia de: hemorragia, infiltrado inflamatorio, gliosis y desestructuración (0-ninguna evidencia y 3 evidencia máxima) [111,112].

Para los estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia las muestras fueron deparafinadas y rehidratadas, e incubadas con anticuerpos anti-GFAP (Sigma-Aldrich, España) y anti-Iba1 (Wako, Neuss, Alemania).

Las formas de la microglía fueron descritas de la siguiente manera:

- *Microglía inactiva*: cuerpo celular oval y pequeño rodeado de numerosas prolongaciones delgadas dispuestas de forma radial con varias veces la longitud del cuerpo celular. Se consideran macrófagos inactivos.
- *Microglía activada*: El cuerpo celular es más grande y las prolongaciones más cortas.
- *Microglía reactiva*: Las células tienen un aspecto ameboide y pueden ser consideradas macrófagos plenamente activados con capacidad migratoria [76,78,79].

Para nuestros propósitos consideramos la microglía activada y reactiva conjuntamente en una escala de 0 a 3: 0 normal <10% reactivas; 1 casi todas inactivas, un 30% aproximadamente reactivas; 2 algunas células inactivas, 60% reactivas y 3, 100% reactivas [113].

4. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

Las variables numéricas cuantitativas o semi-cuantitativas en cada grupo se expresaron como medias con su desviación estándar o intervalo de confianza. Se realizó el estudio estadístico descriptivo según métodos convencionales. La comparación de variables entre grupos se realizó por métodos no paramétricos dado el tamaño de las muestras (Kruskall-Wallis para más de dos grupos y Mann-Whitney para dos grupos). Si los tamaños muestrales, la homogeneidad de los datos y el ajuste de normalidad de la distribución lo justificaron, se usaron métodos paramétricos (ANOVA para más de dos grupos y «t» de Student para dos grupos). Los datos fueron procesados mediante el programa SPSS. La hipótesis alternativa se rechazó si las diferencias entre grupos fueron mayores del 5% (nivel p de significación de 0,05).

5. LEGISLACIÓN

En todos los casos seguimos las indicaciones de la legislación vigente para el cuidado de animales de experimentación en cada periodo (2007-2017). Todos los proyectos tuvieron su aprobación individual del CEBA (informes recogidos en las primeras páginas).

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES EN EL DESARROLLO CORTICAL CEREBRAL EN EL MODELO QUIRÚRGICO

Nueve corderos (de 15, 60%) del grupo A, 3 (de 5, 60%) del grupo B y 2 (de 5, 40%) del grupo C nacieron a término por cesárea. En el grupo B los defectos se encontraban cerrados, en el grupo C los defectos se encontraban abiertos pero cierta cantidad de tejido fibroso los cubría parcialmente. En el grupo A encontramos 5 animales que presentaron un cierre espontáneo del defecto, a pesar de que no se realizó en ellos



Figura 23. Tras la realización del defecto en el día 70 (A), a término el animal solía tener el defecto lumbar completamente abierto (A); sin embargo en algunas ocasiones el defecto lumbar se encontraba cerrado de manera cicatricial. Debemos explicar este hecho como un mecanismo de defensa excelente del propio feto ante una herida.

ningún esfuerzo para su cobertura prenatal. No existió ninguna diferencia en edad gestacional o tamaño del defecto entre aquellos animales en los que el defecto estaba abierto o cerrado dentro del grupo A (fig. 23).

1.1. Malformaciones cerebrales. Descripción anatómica de la corteza cerebral del animal

La proporción de estructuras identificables se encuentra representada en la siguiente figura.

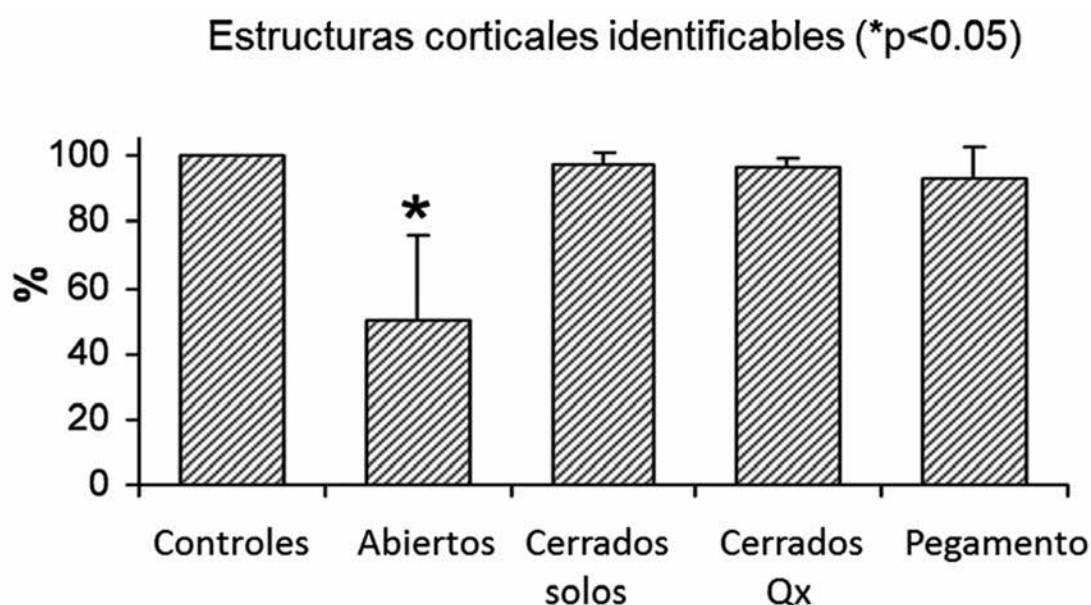


Figura 24. Proporción de estructuras identificables.

1.1.1. Animales normales

El patrón de circunvoluciones y surcos descritos por Louw es claramente visible, y la proporción de estructuras fue del 100% en todos los animales. Todos los surcos se encontraban completamente formados y presentaban una profundidad normal. El aspecto externo era idéntico al patrón descrito en el animal adulto. No encontramos hidrocefalia o malformación de ACII (fig. 25A, C y E).

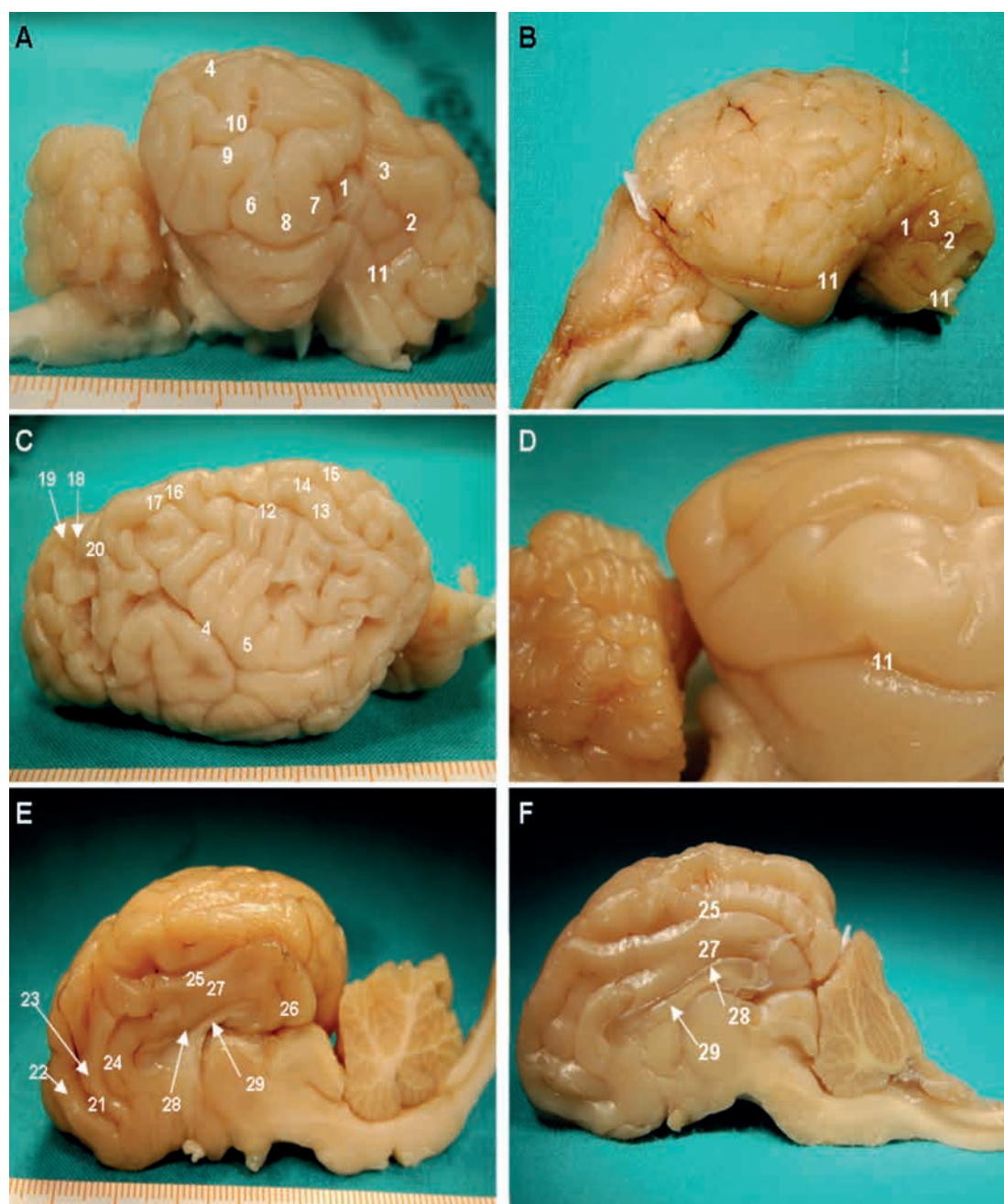


Figura 25. Comparación entre animales normales y no tratados. A, C y E pertenecen a animales normales, y en ellos mostramos visiones laterales, dorsales y mediales de los hemisferios cerebrales izquierdo y derecho. Los surcos son completos y el aspecto es semejante al del animal adulto. También son profundos y todos ellos claramente visibles. El cerebelo presenta una configuración y forma normal y no se observa malformación de ACII. B, D y F Animales no corregidos prenatalmente y nacidos con el defecto lumbar abierto. B. Visión lateral. Pueden observarse grandes diferencias en cuanto a aspecto de los surcos y las circunvoluciones con la imagen A. Únicamente: surco rinal, cisura de Silvio, el surco presilvio y la circunvolución de Silvio rostral son claramente visibles. Los surcos son incompletos y presentan contornos más suaves que los observados en los controles. Las circunvoluciones relacionadas con los surcos oblicuo y ectosilvio no se observan. El surco rinal es visible, pero aparece como una indentación lateral y no se observa claramente en sus porciones rostrales. Una severa herniación cerebelosa se observa también. D. Detalle del surco temporo occipital: El surco rinal se observa bien, sin embargo, las circunvoluciones relacionadas con el surco oblicuo no se observan. La configuración de las circunvoluciones relacionadas con el surco ectosilvio son diferentes de las de los controles. F. Vista medial. Una malformación de ACII severa puede observarse. Los surcos y las circunvoluciones se observan pero con profundidad poco marcada. El surco endoesplénico no se observa y los surcos coronal y cruciatus no se observan claramente.

1.1.2. Animales no corregidos prenatalmente sin cierre espontáneo (4 animales del grupo A)

La pérdida continua de LCR producida en el modelo se asoció a desarrollo cortical anómalo. Menos del 80% de las estructuras corticales fueron identificadas (en el caso 1 menos del 20%). La diferencia en la proporción de estructuras identificables de este grupo frente a otras modalidades de cobertura prenatal fue significativamente inferior ($p < 0,05$) (fig. 24). Los surcos se formaron de manera incompleta y fueron menos profundos que los encontrados en los animales control. Los patrones anormales fueron encontrados principalmente en las áreas temporales y occipitales con un rango de malformaciones que osciló entre áreas extensas de polimicrogiria a paquigiria incompleta y la presencia de surcos y circunvoluciones rudimentarias (figs. 26B, D, F y fig. 27). También encontramos ACII e hidrocefalia.

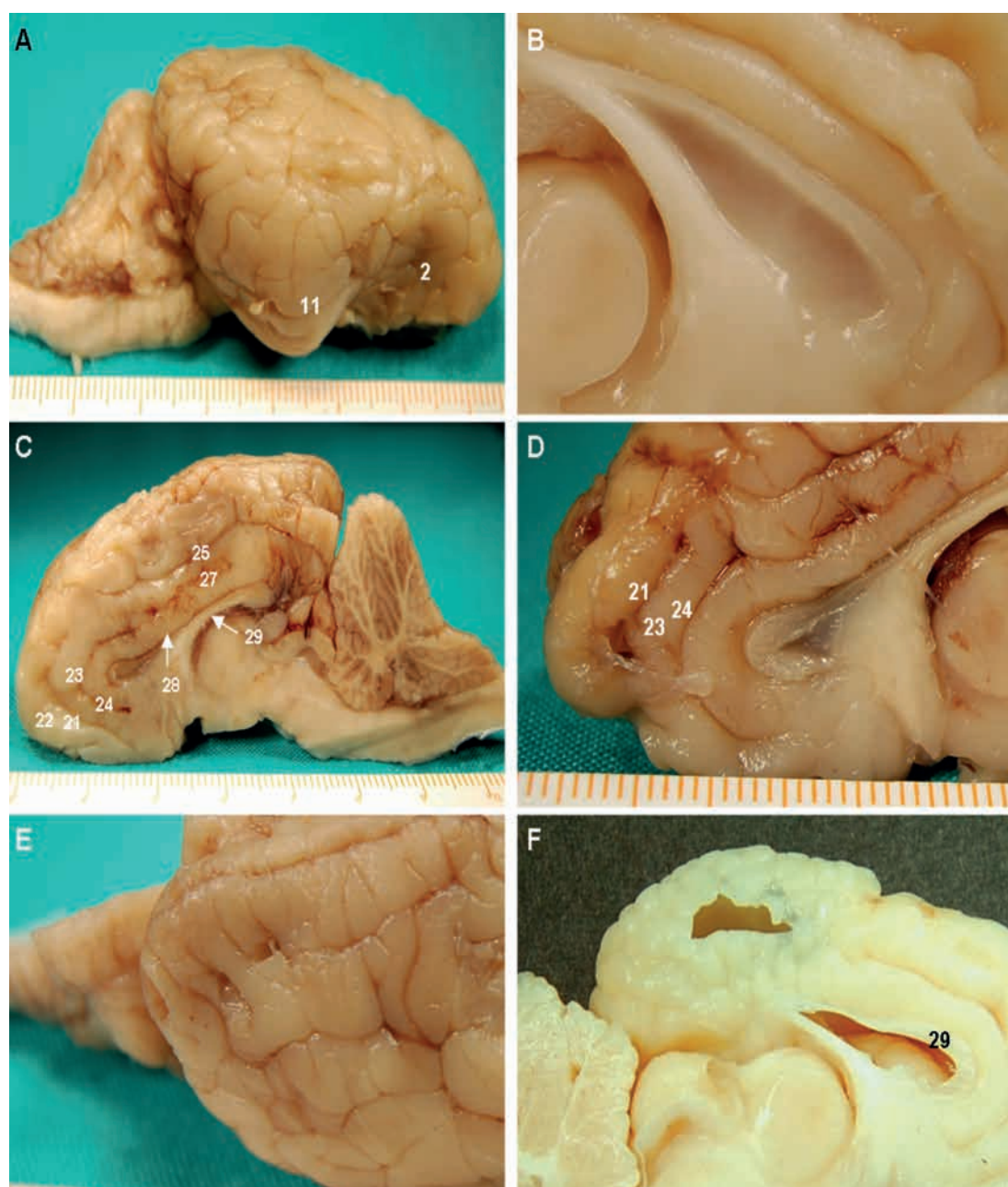


Figura 26. Animales no corregidos prenatalmente y sin cierre espontáneo del defecto. A. Vista lateral. Ausencia del patrón normal de circunvoluciones y surcos. Solamente el surco presilvio y el surco rinal están presentes y son menos profundos que los observados en los controles; de hecho el surco presilvio se encuentra prácticamente ausente. También encontramos la malformación de ACII. B. Visión medial. Hidrocefalia moderada. C. Visión medial. Los surcos y las circunvoluciones están presentes pero con menor profundidad. El surco endoesplenialis no se observa y los surcos coronal y cruciata no se observan claramente. D. Vista medial, detalle de los lóbulos frontales. El surco endogenualis y la circunvolución ectogenualis son normales. Hay una ausencia de continuidad en el surco ectogenualis y la circunvolución genualis también está incompleta. E. Detalle del lóbulo occipito-temporal. Presencia de contornos suavizados. El patrón de surcos y circunvoluciones normal se encuentra completamente ausente, patrón que podríamos describir como paquigiria. F. Vista medial. En esta vista podemos comprobar que las áreas de polimicrogiria que afectan a los lóbulos occipital y temporal afectan también a sus aspectos mediales. El diencéfalo, el cerebelo y el tronco son normales en esta vista, pero las porciones posteriores del cuerpo calloso se encuentran más adelgazadas que las anteriores. Se puede observar una hidrocefalia marcada en los ventrículos laterales.

1.1.3. Cirugía fetal abierta, cobertura con pegamento y cierre espontáneo (grupos B y C y 5 animales del grupo A)

Cualquier tipo de cobertura prenatal que impidiese la pérdida de LCR durante la gestación se asoció a surcos y circunvoluciones identificables. Los surcos se encontraron completamente formados y más del 95% de las estructuras fueron encontradas (fig. 24). Cuando el defecto espinal se cubrió con pegamento, los cambios corticales fueron ligeramente más severos, y la posibilidad de identificar estructuras en la corteza, ligeramente menor. La ausencia del surco endoesplialis en los animales tratados con pegamento es especialmente interesante por su proximidad a la fosa posterior donde la mayor parte de las malformaciones se concentraron. En estos animales el pegamento fue insuficiente por si solo para parar la pérdida de LCR y desarrollaron ACII. Estas malformaciones no se observaron en animales con un cierre espontáneo, sugiriendo que el pegamento no solo no fue capaz de parar la salida de LCR sino que evitó el cierre cicatricial del defecto. Los animales tratados con cirugía fetal abierta y cierre espontáneo presentaron una proporción superior de estructuras indetectables e inferior de ACII e hidrocefalia que los grupos tratados con pegamento o los que nacieron con el defecto abierto (figs. 24 y 27).

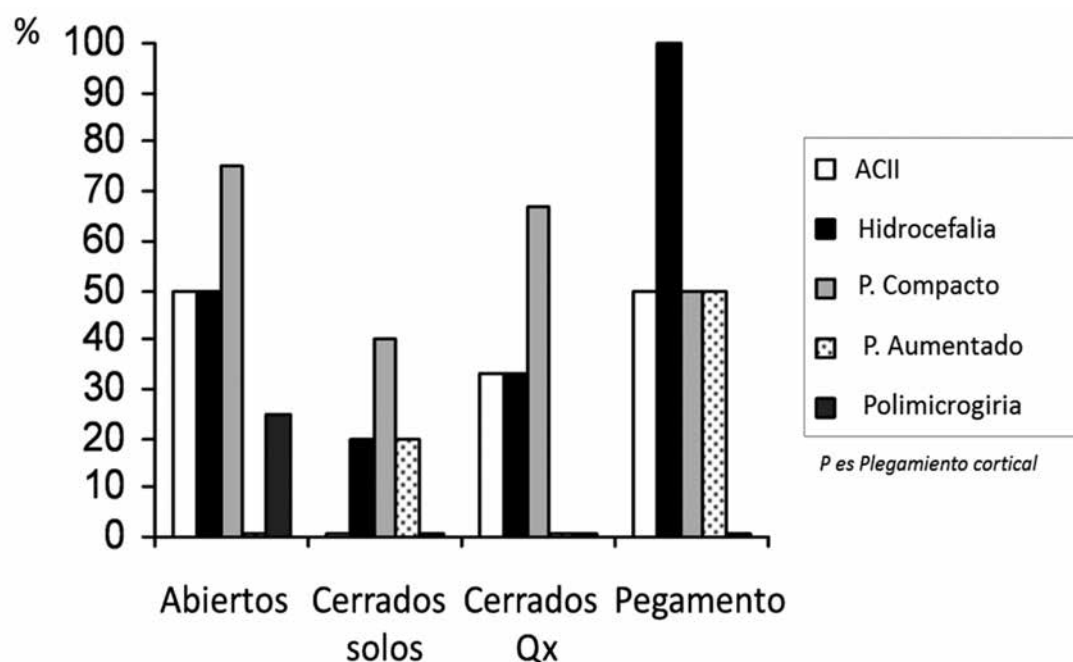


Figura 27. Descripción de malformaciones según tipo de cobertura.

1.2. Peso de los cerebros

El peso de los cerebros con el defecto abierto sin cierre espontaneo fue significativamente menor que el peso en el resto de los grupos.

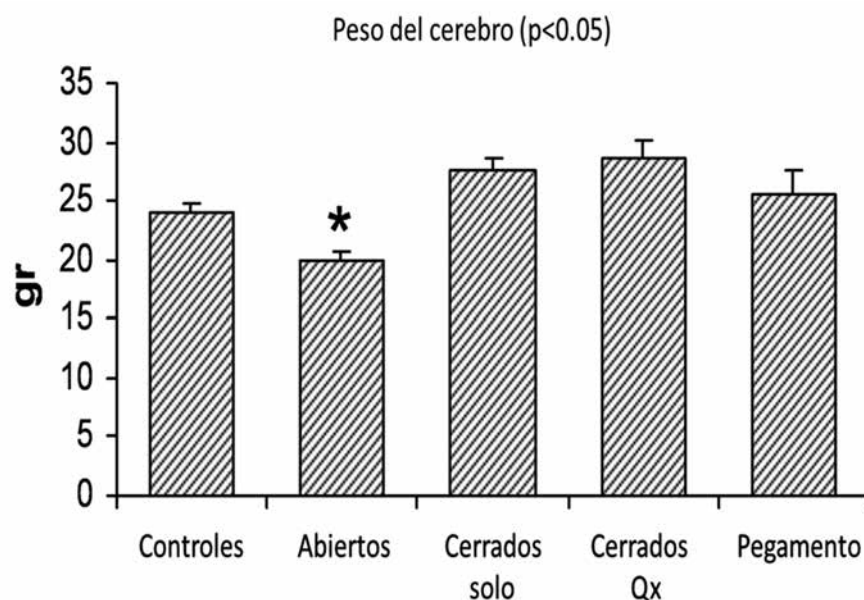


Figura 28. Pesos.

1.3. Hidrocefalia

Encontramos hidrocefalia en todos los grupos excepto en los controles (fig. 27). Dos de ellos (2/5; 40%) se encontraban asociadas con ACII y uno (1/5) se encontró asociado con denudación endimaria.

1.4. Anomalías en el plegamiento cerebral y otras anomalías histológicas encontradas

El día 70 de gestación, los cerebros de corderos normales muestran los primeros surcos y la presencia de migración neuronal (fig. 29). Postnatalmente, el estudio de los cortes coronales nos permitió describir dos patrones anómalos en el desarrollo de la corteza cerebral: *paquigiria* y *polimicrogiria*. Ambos patrones aparecieron en realidad en todos los grupos excepto en los controles, si bien en los grupos con cierre prenatal

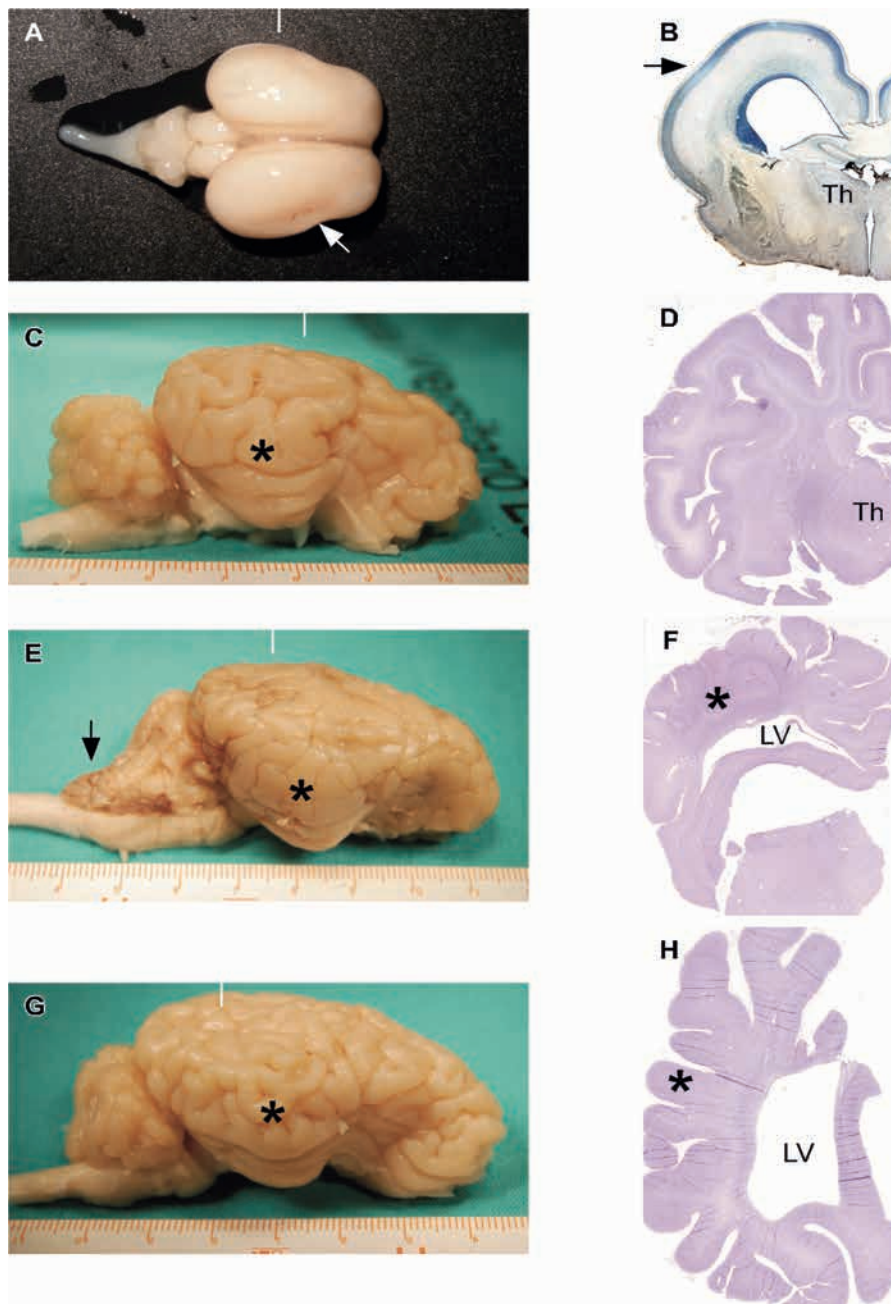


Figura 29. Anomalías en el desarrollo cortical y en el plegamiento cerebral. A. Cerebro prenatal de un cordero normal (día 70). En esta imagen es posible apreciar la aparición de los primeros surcos (flecha blanca). B. Corte coronal del cerebro de la imagen A. En esta imagen podemos observar la migración de células desde la matriz germinal hacia la corteza en desarrollo donde los primeros surcos empiezan a aparecer; la flecha negra en este caso muestra el mismo surco que mostraba en la imagen anterior la flecha blanca (usamos para esta imagen la tinción de Nissl; th. Tálamo). C. Imagen macroscópica de un cerebro normal en el que podemos observar el patrón normal de plegamiento cortical. El asterisco en la imagen muestra una circunvolución normal. D. Sección coronal del cerebro de la imagen C mostrando surcos profundos y circunvoluciones normales (HE; th. tálamo). E. Imagen macroscópica de un cerebro mostrando el aspecto de patrón de plegamiento que se asemeja a la paquigiria. El asterisco marca una región de circunvoluciones gruesas y surcos poco profundos; la flecha indica la presencia de malformación de ACII. F. Sección coronal del cerebro de la imagen E. El asterisco marca una zona que corresponde a circunvoluciones gruesas y surcos poco profundos; el ventrículo lateral (LV) se encuentra ligeramente aumentado de tamaño (HE). G. Imagen macroscópica de un cerebro mostrando el patrón de semejanza a la polimicrogria; el asterisco marca circunvoluciones finas (comparadas con las áreas marcadas con asteriscos de las imágenes C, E y G). H. Sección coronal del cerebro de la imagen G. El asterisco marca una región de surcos profundos y circunvoluciones finas. El ventrículo lateral (LV) se encuentra moderadamente dilatado. Las marcas verticales blancas en las imágenes C, E y G muestran los niveles de las secciones coronales de D, F y H.

mediante cirugía fetal abierta y aquellos fetos en los que el cierre fue espontáneo los patrones de plegamiento fueron normales en su mayor parte.

La *polimicrogiria* propiamente dicha, entendida como circunvoluciones finas con ausencia de las capas corticales normales, fue encontrada únicamente en el grupo sin tratamiento fetal y sin cierre espontáneo del defecto.

1.5. Anexo 1 en el estudio del desarrollo cerebral del modelo quirúrgico

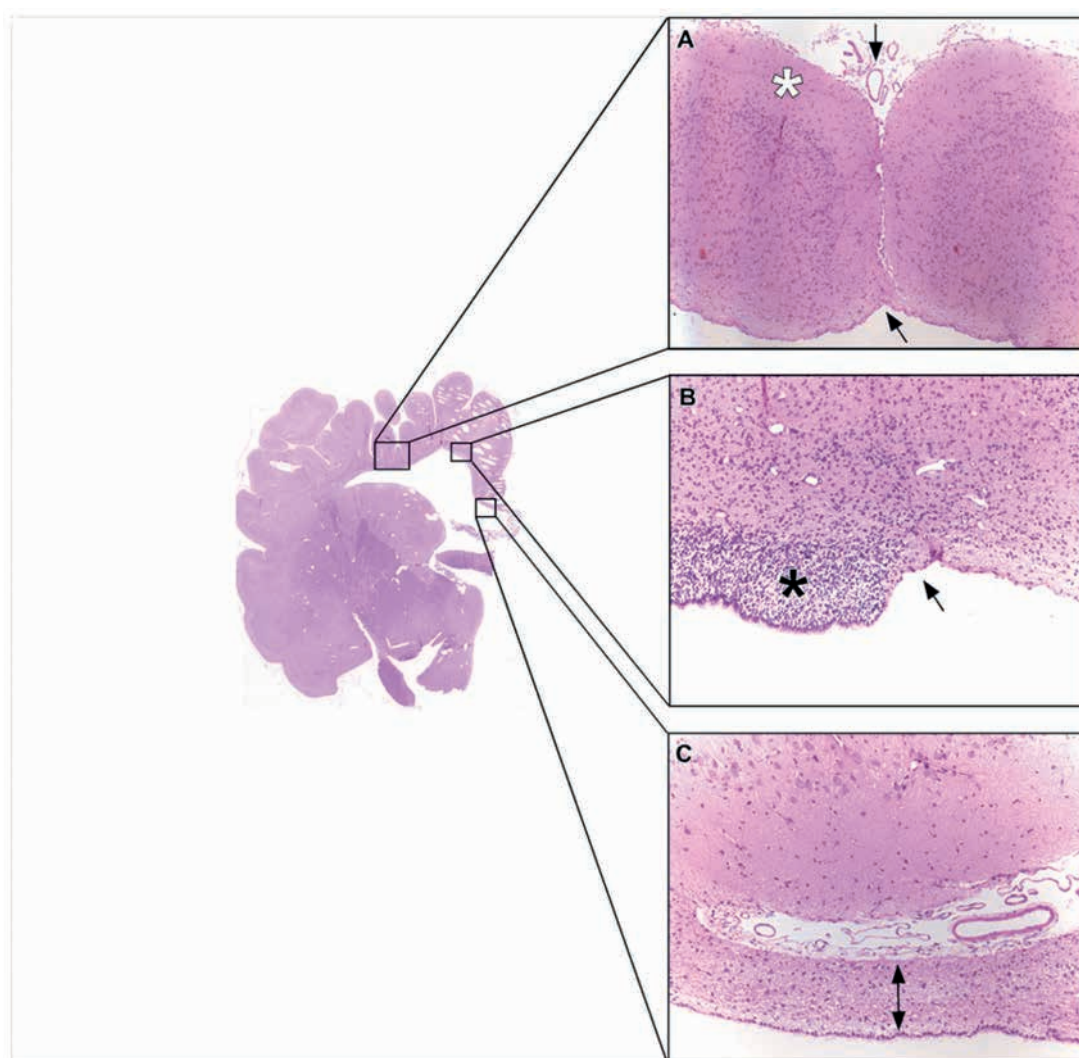


Figura 30. A. Alteraciones en la estructura cortical. Capa molecular (asterisco blanco) y región inferior desestructurada. Circunvoluciones poco profundas se fusionan en zonas cercanas a vasos menínges (flecha negra superior). La región endimaria falta (flecha negra inferior). B. El asterisco negro muestra restos de la matriz endimaria recubierta de epéndimo. Existe una transición brusca entre las áreas cubiertas de epéndimo y zonas denudadas (flecha negra). C. Cuerpo callosos adelgazado.

En algunas zonas de las regiones polimicrogíricas (fig. 30A) pudimos observar la existencia de áreas extensas de denudación endimaria (fig. 30B). En estas mismas regiones, y asociándose a áreas donde la ventriculomegalia era especialmente prominente pudimos encontrar adelgazamiento de las regiones posteriores del cuerpo calloso (fig. 30C).

Estos hallazgos fueron aislados y no pudimos considerarlos en la cuantificación general de malformaciones descritas, aunque es importante describirlos al aparecer únicamente en animales en los que no existió ningún esfuerzo de cobertura prenatal y al tener quizá la denudación endimaria alguna base de las teorías etiopatogénicas que trataremos en la Discusión.



Figura 31. Imagen de polimicrogiria marcada con gran hidrocefalia asociada.

1.6. Anexo 2 en el estudio del desarrollo cerebral del modelo quirúrgico

La malformación de ACII ya había sido previamente descrita en el modelo. Nosotros no hicimos esfuerzo en medir la proporción del cerebelo herniado.



Figura 32. ACII según tipo de cobertura.

El ACII era más frecuente en animales que nacieron con el defecto abierto y en los tratados con pegamento (figs. 27 y 32).

1.7. Técnicas fetoscópicas en la cobertura del defecto lumbar

Durante nuestro trabajo utilizamos 2 técnicas fetoscópicas distintas; básicamente buscaban acceder a la cobertura del defecto sin necesidad de realizar una histerotomía y por lo tanto teóricamente disminuyendo la tendencia al parto pretérmino. En los dos casos utilizamos Helio como gas de distensión uterino.

El número de animales fue de 10 (5 en cada técnica). En este sentido, únicamente registramos el momento del parto y el tiempo quirúrgico. No encontramos diferencias significativas en el momento del parto (130 ± 3 días en pegamento vs 135 ± 2 días en parche). Sin embargo el procedimiento con Duragen fue considerablemente más largo y más difícil (60 ± 20 minutos en pegamento frente a 240 ± 35 minutos en parche).

2. ESTUDIO DEL DEFECTO LUMBAR EN EL MODELO QUIRÚRGICO UTILIZANDO MATRICES

En los animales tratados prenatalmente con matrices no encontramos ninguna alteración externa al nacimiento, siendo el aspecto muy semejante al de los animales normales.

2.1. Descripción macroscópica

En los dos animales operados a término, ambos presentaron una herida lineal fina bien cicatrizada en la región lumbar y una cintura pélvica que parecía de menor tamaño que la habitual. En el animal 1 el cordón umbilical se había enrollado alrededor del miembro superior produciendo una ligera deformidad de éste. Los cerebros presentaron alteraciones semejantes a las descritas en el apartado 1, en forma de ventriculomegalia y *paquigiria*.

Sobre el defecto lumbar, la piel era adherente a las capas medulares profundas. Las láminas posteriores faltaban. La médula espinal se encontraba aplanada de L4 a L7. La matriz externa era completamente visible, no se encontraba encapsulada y estaba parcialmente integrada, pero no de manera muy marcada, en el tejido espinal subyacente.

2.2. Descripción microscópica

Los animales controles no mostraron ninguna alteración.

Los animales en los que se hizo el procedimiento presentaron una pérdida significativa de sustancia blanca dorsal con separación de las astas ventrales en la tinción con mielina (fig. 33). En las tinciones para los cuerpos neuronales pudo comprobarse la persistencia de éstos en las astas ventrales.

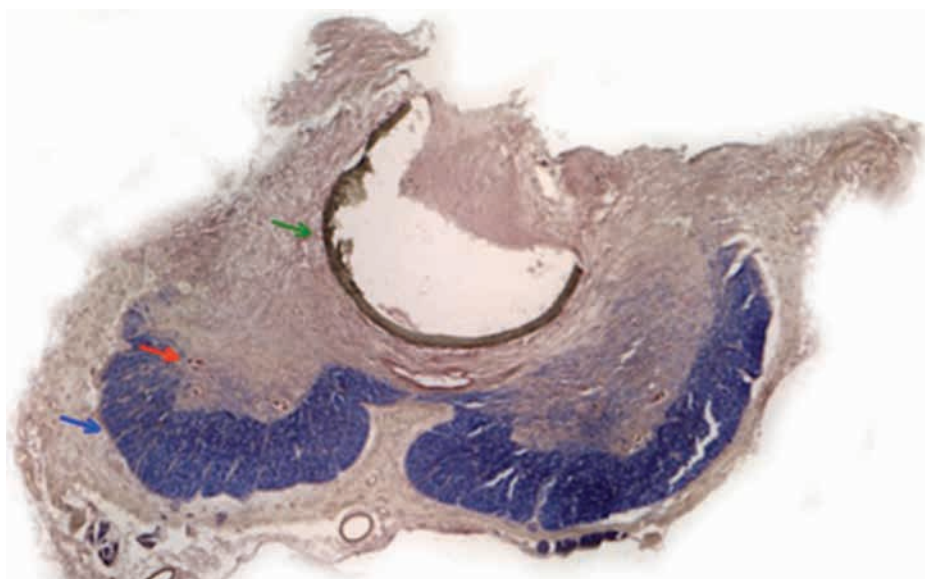


Figura 33. Flecha naranja: la matriz se encuentra en el sitio en el que fue colocada. Flecha roja: presencia de cuerpos neuronales. Flecha azul: separación de las astas ventrales.

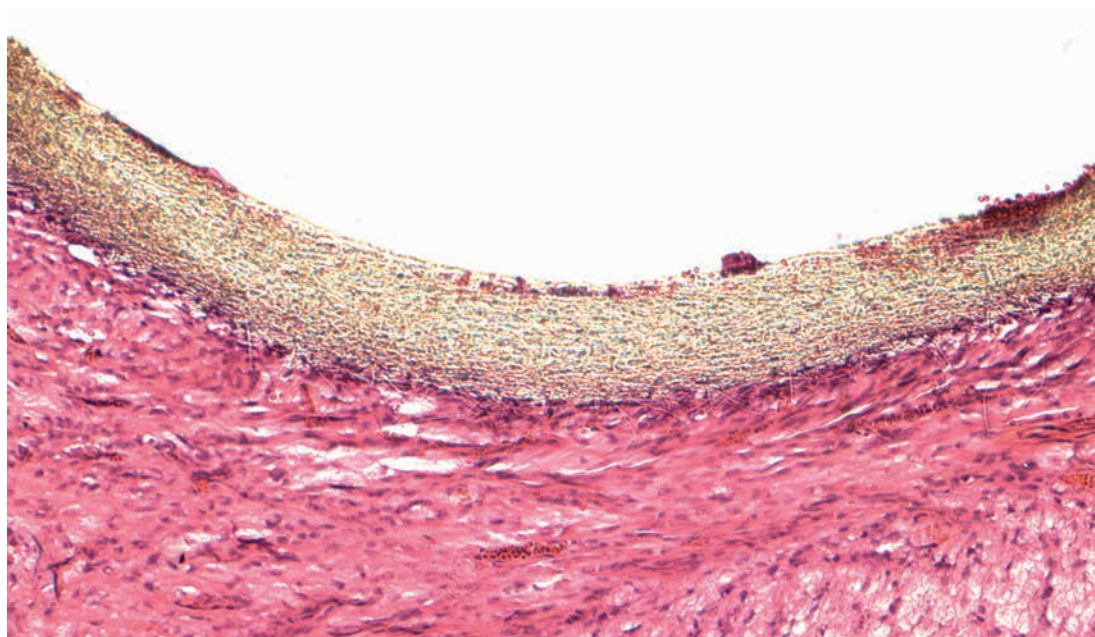


Figura 34. Detalle de la matriz en contacto con el tejido neural. La matriz interna pudo observarse en el lugar en el que fue dispuesta prenatalmente. El estudio con HE demostró la ausencia de infiltrado linfocítico local o crecimiento anormal cicatricial en la zona.

3. ESTUDIO DEL DEFECTO LUMBAR EN EL MODELO TERATOGENICO

Los animales con MMC (aproximadamente un 60% de los nacidos de madres tratadas con ácido retinoico) presentaron lesiones en el área lumbar y sacra semejantes a las que se encuentran en la enfermedad humana. Macroscópicamente, los fetos presentaron ausencia de piel en la región lumbar, ausencia de arcos posteriores, fusión meníngea y el tejido neural expuesto y abierto (fig. 35).

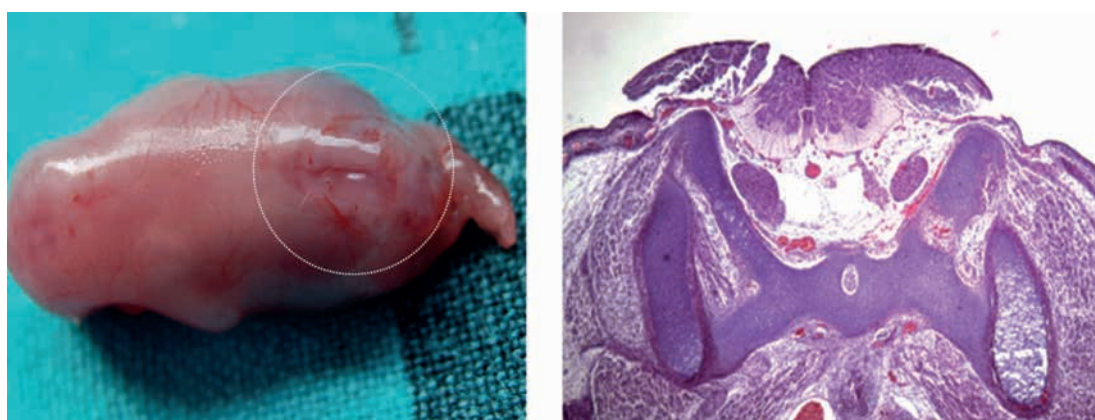


Figura 35. Animal a término con el defecto lumbar marcado por un círculo a la izquierda. A la derecha el mismo defecto teñido con HE en el que puede observarse la similitud anatómica con la enfermedad humana.

3.1. Análisis histopatológico

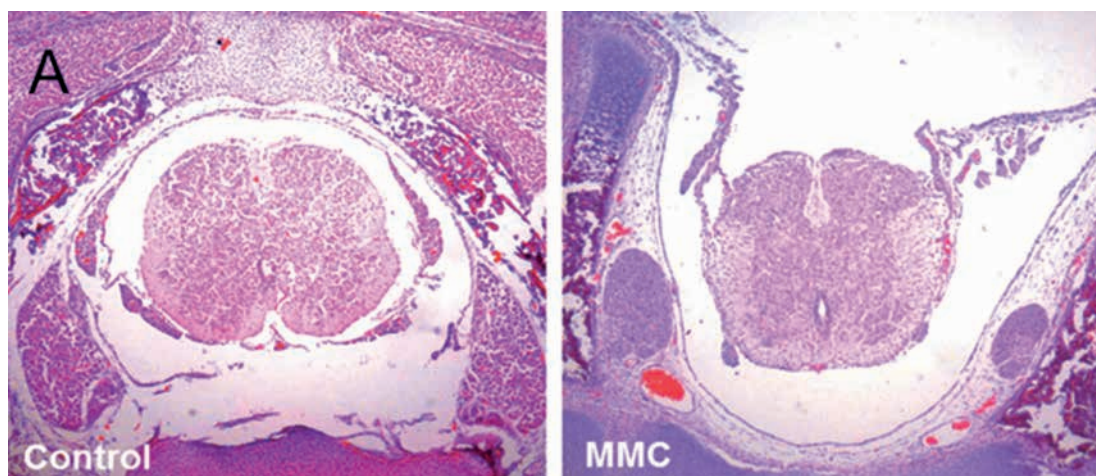


Figura 36. HE. Los controles fueron normales. Los animales con MMC mostraron un patrón alterado en las áreas dorsales y motoneuronas escasas. También se encontraron áreas de vacuolización, gliosis y atrofia, así como áreas de edema, calcificación focal, fibrosis y proliferación celular capilar.

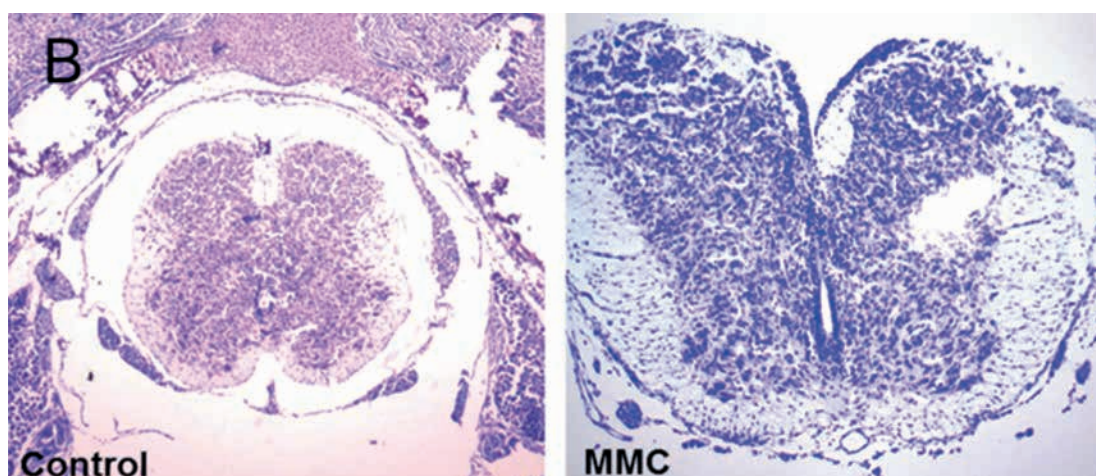


Figura 37. Nissl. Encontramos aplanamiento de las astas posteriores y alteración de las regiones endimarias que se encontraban distorsionadas y alargadas así como en algunas zonas denudadas.

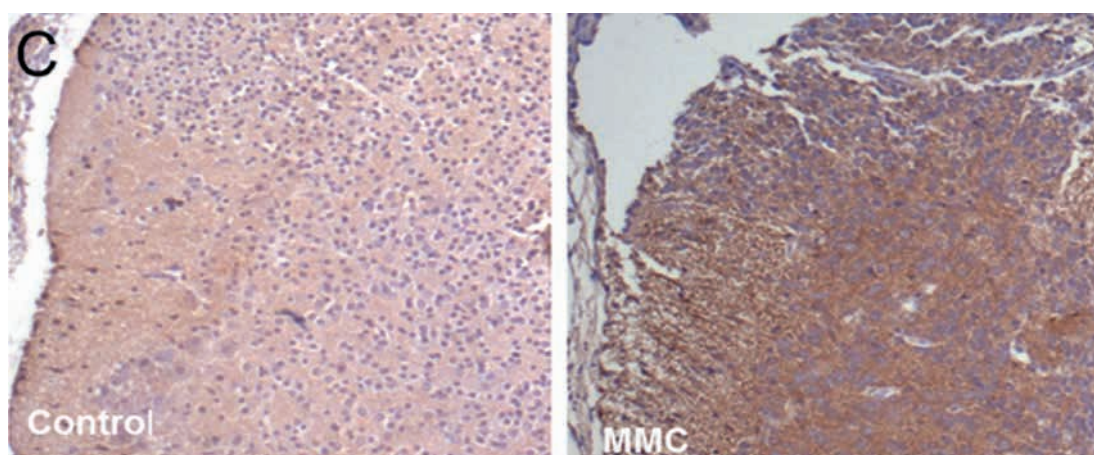


Figura 38. GFAP. En los animales control encontramos una tinción marrón clara mientras que los animales con MMC mostraron una tinción más oscura, observándose la presencia de astrocitos y escasez de motoneuronas.

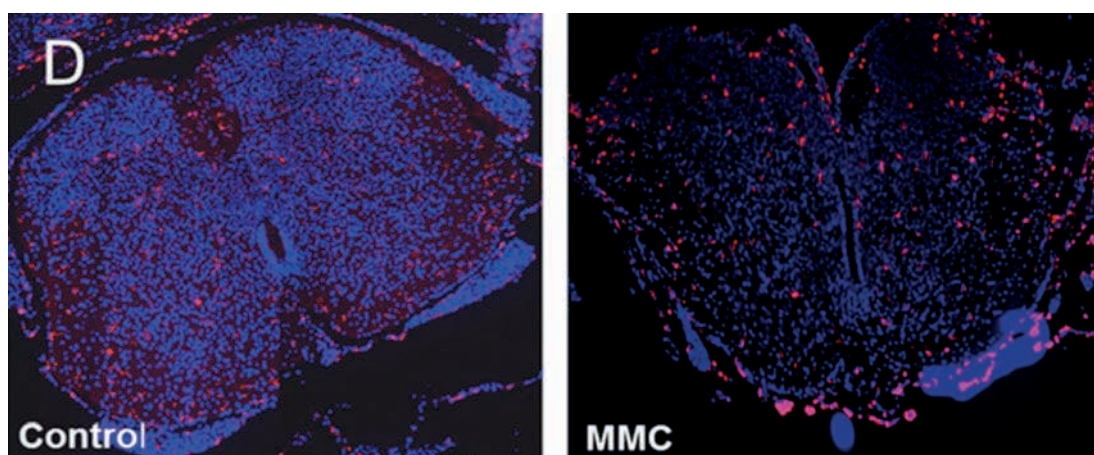


Figura 39. Iba-1. En los controles a término la tinción de microglía es escasa, sin embargo en los animales con MMC la tinción es más difusa y marcada con tendencia a ser más marcada en las regiones expuestas al líquido amniótico.

Todas las imágenes recogidas a 5x.

3.2. Estudio del daño en el tejido neural expuesto a medida que avanza la gestación

En la figura 40 puede observarse como todas las alteraciones típicas del daño por exposición al líquido amniótico son más marcadas a medida que avanza la gestación, existiendo en estadios finales de la misma ausencia de tejido en las zonas más afectadas.

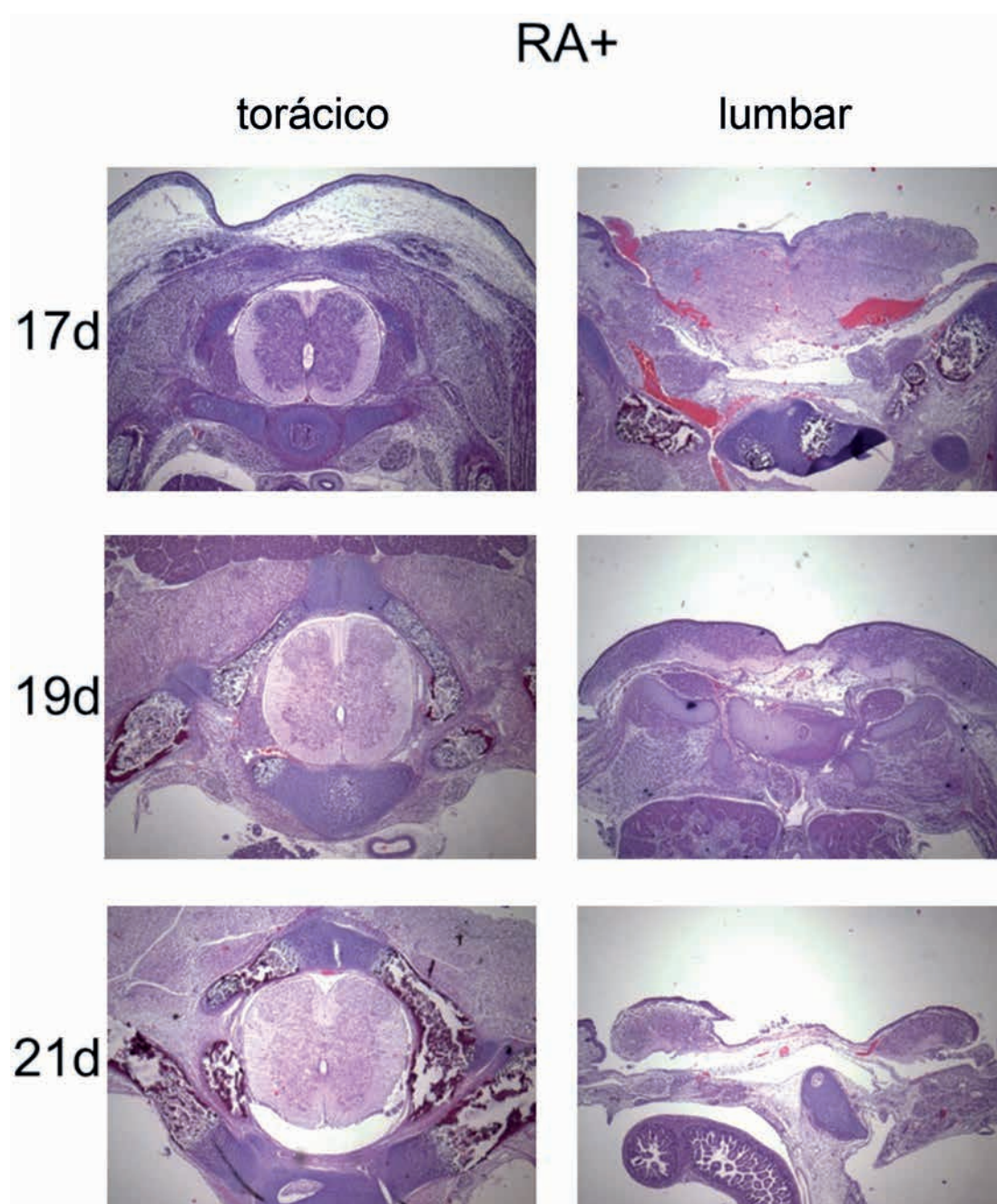


Figura 40. (5x) Evolución del daño neuronal en las regiones lumbares a medida que avanza la gestación.

3.2.1. Cuantificación del daño neural

En la escala utilizada se recogen distintos parámetros de lesión que se contabilizan del 0 a 3, y que quedan recogidos en Material y Métodos. Brevemente, la asignación de un valor a cada muestra fue hecha por un único patólogo desconociendo el

grupo de la muestra que describía y basándose en hemorragia, cambios estructurales y gliosis (fig. 41).

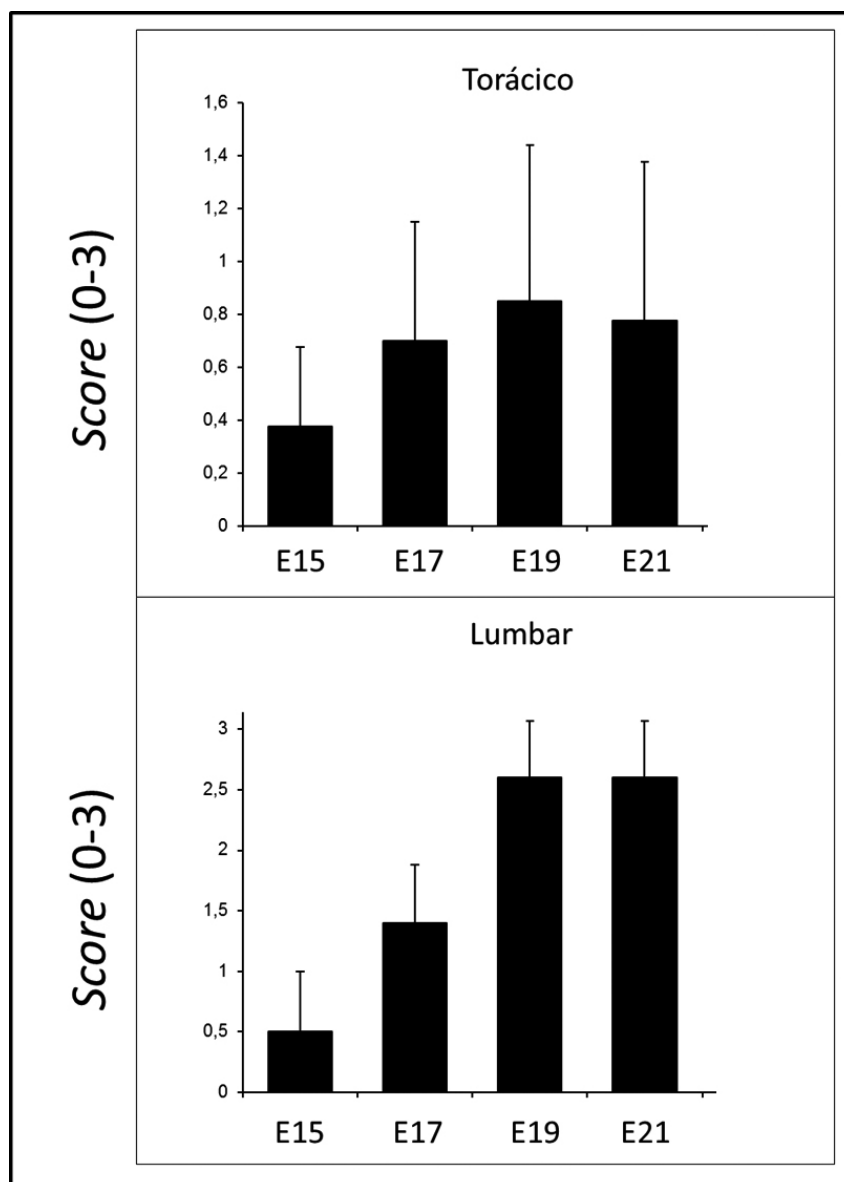


Figura 41. En las regiones no expuestas al líquido amniótico (torácicas) las escalas de daño son inferiores a las de las regiones expuestas. Encontramos diferencias significativas en E19 entre regiones torácicas y lumbares ($p < 0,05$).

En las regiones expuestas, el daño aumenta de manera progresiva hasta el final de la gestación, obteniéndose en todos los estadios valores superiores a los obtenidos en regiones no expuestas.

3.2.2. Estudio de la reactividad de la microglía en las regiones expuestas

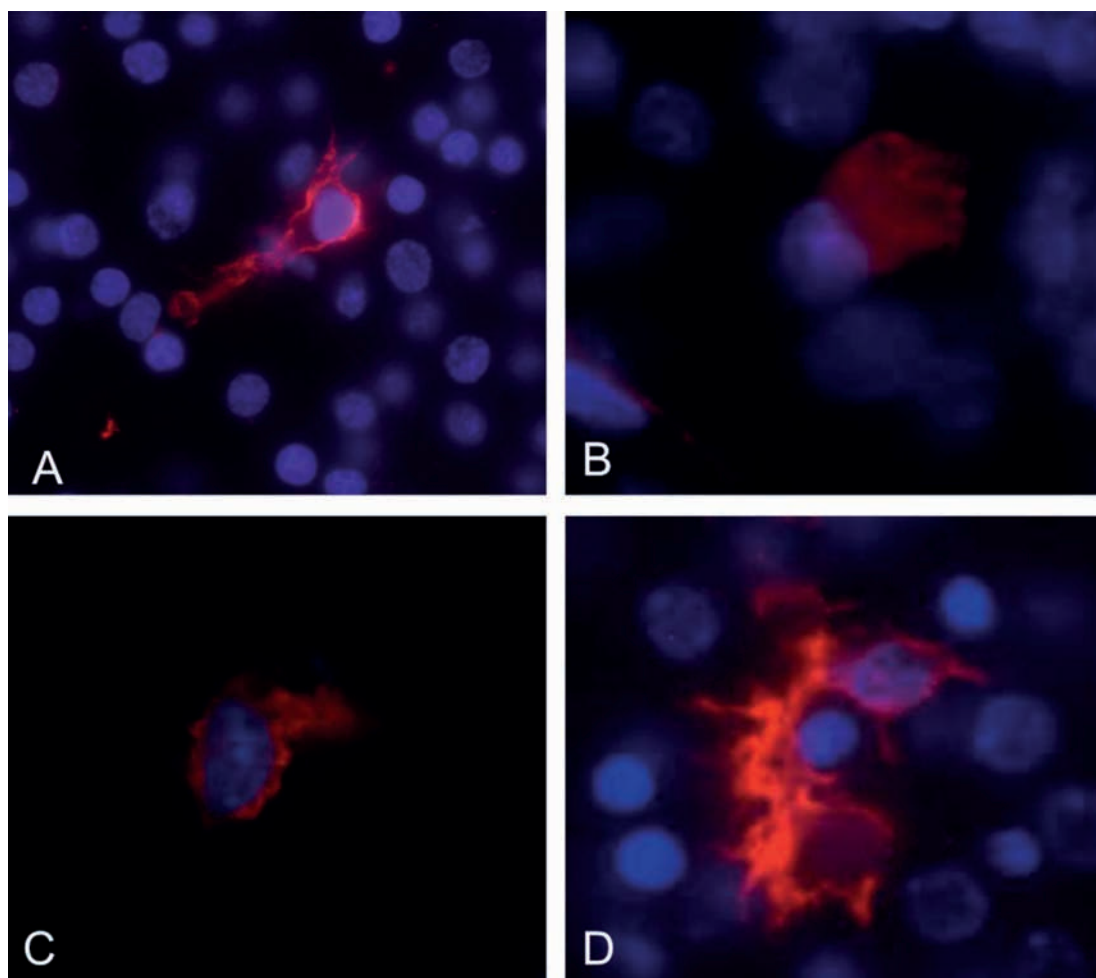


Figura 42. Ejemplos de aspecto de la microglía en las regiones lumbares expuestas. A. No activa. B. Activada y C + D Reactiva.

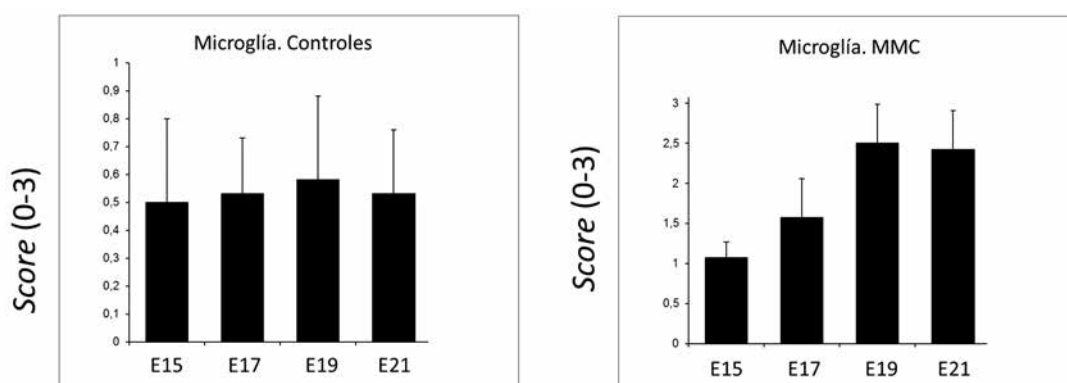


Figura 43. Regiones lumbares de controles y MMC. En los controles puede observarse una expresión constante de microglía no activada a lo largo de la gestación. Por otro lado, existe un aumento de la proporción de microglía activada y reactiva a medida que avanza la gestación en el MMC. Encontramos diferencias significativas en E19 entre controles y MMC ($p < 0,05$).

3.2.3. Descripción de la respuesta local a la colocación de matrices en el modelo teratogénico

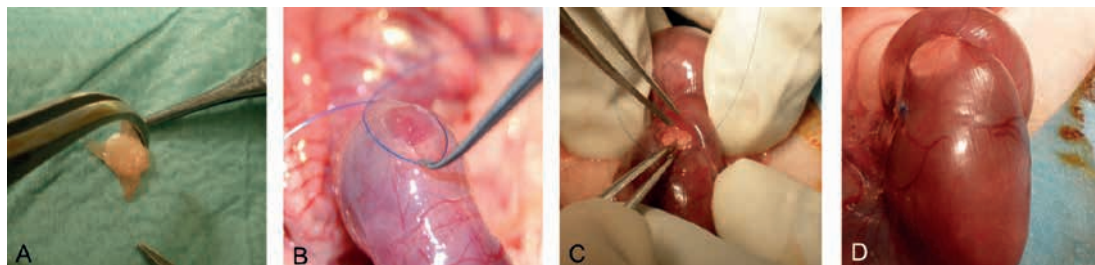


Figura 44. Colocación de membranas sobre el defecto en el modelo teratogénico. Los discos de policaprolactona son adheridos a la región lumbar mediante pegamento y el útero es cerrado mediante una bolsa de tabaco.

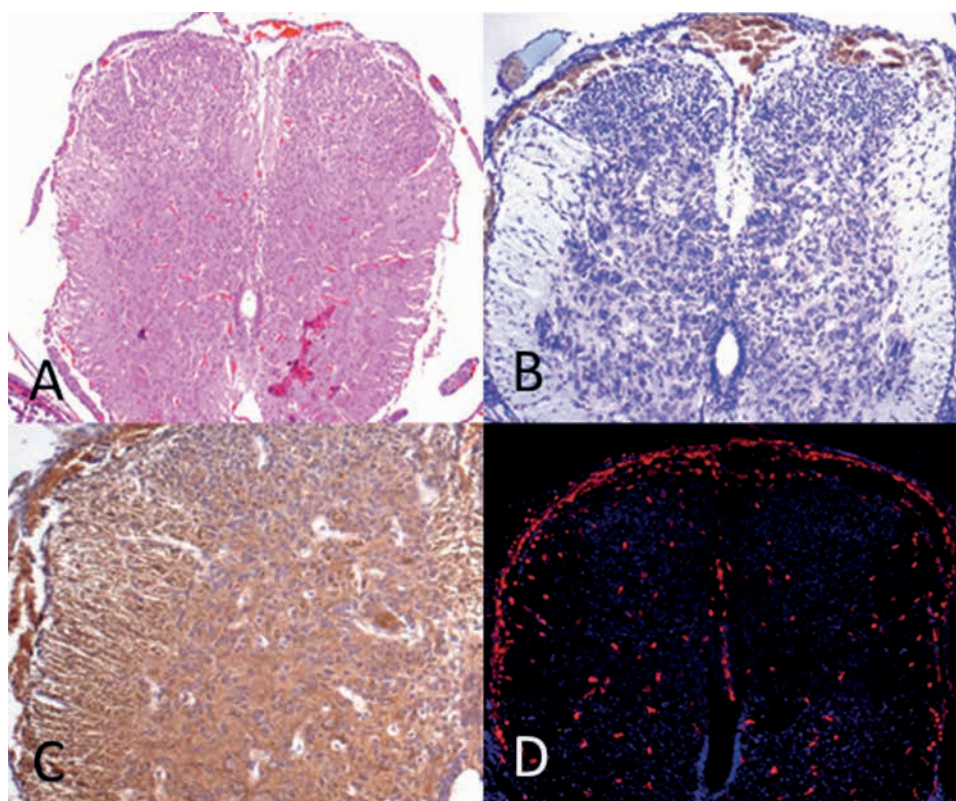


Figura 45. A HE y B Nissl. Se observa una fina capa de tejido fibroso con hemorragias locales en la zona de contacto con la matriz. C. GFAP La matriz no produce aparentemente ningún efecto beneficioso sobre la médula expuesta. D Iba-1 La respuesta microglial es muy marcada especialmente en las regiones en las que la matriz ha estado en contacto con el tejido neural.

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

Este trabajo describe la presencia de malformaciones corticales cerebrales en el modelo quirúrgico de MML y sugiere su relación con la pérdida de LCR.

La formación de la corteza cerebral comienza cerca de la sexta semana de gestación en las regiones ventral y dorsal de la matriz germinal. Las neuronas glutaminérgicas se forman en las regiones dorsales de la matriz, y desde allí migran radialmente hacia la corteza en desarrollo; en este proceso, la existencia de fibras gliales radiales que actúan como guía tiene gran importancia.

Por otro lado, las neuronas gabaérgicas producidas en las regiones ventrales de la matriz germinal tienen una ruta más compleja hacia la corteza, migrando mediante movimientos radiales y tangenciales.

Al llegar a la corteza, las neuronas que han migrado reciben señales de las células de la capa molecular, se desprenden de las fibras gliales que sirvieron como guía y establecen contacto con otras células de regiones corticales y subcorticales en un proceso denominado *organización cortical*. En los estadios finales de la migración, la pia y las leptomeninges tienen también un papel señalizador de gran importancia.

La interferencia con cualquiera de estos procesos de migración, proliferación u organización da lugar a un gran espectro de malformaciones que podemos denominar *malformaciones del desarrollo cortical* [114-117].

Las alteraciones en el plegamiento cortical pueden ser observadas en muchas de estas malformaciones, probablemente porque la estratificación de neuronas corticales está alterada o porque sus conexiones axonales son anómalas; sin embargo, el origen preciso del plegamiento cortical normal no está completamente aclarado [118,119].

1. PATRONES DE PLEGAMIENTO CORTICAL EN EL PACIENTE HUMANO CON MMC Y HALLAZGOS EN EL MODELO QUIRÚRGICO

Los estudios mediante resonancia magnética de la corteza cerebral de pacientes con MMC han mostrado una reducción del espesor cortical en las regiones occipito-temporales, y un aumento del espesor en las regiones frontales, todo ello comparado con controles sanos de la misma edad [120].

Estas alteraciones en el desarrollo cortical normal se podrían corresponder con las fortalezas y debilidades cognitivas que presentan los pacientes con MMC. Estos mismos autores sugieren también que estas áreas de engrosamiento y adelgazamiento se corresponden en realidad con áreas en las que la complejidad cortical se encuentra aumentada o disminuida [120].

De la misma manera que en el humano, nosotros encontramos en el modelo quirúrgico áreas de *paquigiria* y *polimicrogiria* dispersas por toda la corteza, pero principalmente localizadas en las regiones temporales y occipitales.

En humanos, estas alteraciones o modificaciones de los patrones de plegamiento, no pueden ser considerados patológicas en sí mismas sino simplemente relacionadas con alteraciones en la densidad de las conexiones neuronales y con diferencias de dominios en las funciones cognitivas [120,121]. Aunque no podamos considerarlas patológicas, en nuestro trabajo con ovejas, estas anomalías en el desarrollo solamente faltaron en los controles.

Únicamente la cirugía fetal abierta fue capaz de prevenir la aparición de estas alteraciones y no completamente.

2. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO QUIRÚRGICO Y DE SUS SEMEJANZAS CEREBRALES CON LA ENFERMEDAD HUMANA

En las series de necropsias de pacientes con MMC descritas por Gilbert, el 92% de los niños presentaron algún tipo de malformación cortical, incluyendo: heteroto-

pías periventriculares, polimicrogiria y en algunos casos disrupciones graves y profundas del desarrollo cerebral [122]. Otros autores han descrito resultados semejantes [123,124].

Trabajando con el modelo quirúrgico de MMC en oveja, von Koch describió algunas alteraciones en el desarrollo axonal de las regiones de la fimbria, sugiriendo que el modelo presentaba sólo alteraciones cerebrales en esta zona. Esta misma autora no describió ni las alteraciones corticales halladas en nuestro trabajo, ni la presencia de ventriculomegalia [67].

La cronología del plegamiento cortical en la oveja ha sido bien descrita por Louw [106]. Siendo un mamífero grande, el patrón es bastante constante y la nomenclatura se encuentra bien establecida. Este hecho nos fue de gran ayuda para el desarrollo de nuestro trabajo.

En nuestro estudio con el modelo quirúrgico hemos podido comprobar que cualquier tipo de cobertura prenatal incluida la bien descrita tendencia al cierre espontáneo (descrita anteriormente por Meuli [63,60]), asocia pesos normales y mejoras en el desarrollo cortical que asemejan los hallazgos de los de los patrones normales descritos por Louw.

Por otro lado, aquellos animales en los que existió pérdida de LCR durante la última mitad de la gestación, presentaron pesos significativamente menores y anomalías en el desarrollo cortical cuantificable mediante la proporción de estructuras observables.

Como en el humano, estas malformaciones oscilan entre áreas de moderada *paquigiria* a áreas extensas de *polimicrogiria* con desestructuración de la corteza y áreas de heterotopia.

Si añadimos a estas malformaciones corticales el adelgazamiento de algunas regiones del cuerpo calloso y la presencia de ventriculomegalia, podemos afirmar que existen enormes semejanzas entre el desarrollo cerebral del modelo y las alteraciones descritas en la enfermedad humana [125].

3. POSIBLES MECANISMOS DE ALTERACIONES EN EL DESARROLLO CORTICAL EN EL MODELO

Dos razones principales podrían estar asociadas con estas malformaciones:

- 1) Distintos estudios en el humano y en modelos animales han descrito que el LCR tiene, en condiciones normales, distintas moléculas esenciales relacionadas con la proliferación y la migración neural [126]. La pérdida de LCR durante la mitad de la gestación podría asociarse a alteraciones de las concentraciones de estas moléculas, lo que podría tener efectos malformativos corticales impredecibles. Siendo la cirugía fetal abierta la única técnica en la que se lleva a cabo un cierre estanco de la dura mediante una sutura continua de monofilamento, tiene sentido pensar que ésta sea la única técnica capaz de prevenir con cierta efectividad estas malformaciones.
- 2) Las células ependimarias fetales pueden liberar distintas moléculas a través de sus prolongaciones basales, que se extienden en la matriz germinal y la sustancia blanca [127]. Ya que uno de los papeles del epéndimo es mantener las fibras gliales [128], una disrupción tardía como la que producimos nosotros en este modelo, podría producir alteraciones en la migración neural en áreas previamente bien desarrolladas.

Los resultados de de Wit et al. [125] apoyarían esta teoría; trabajando con MMC humano fetal describieron que la denudación ependimaria y la migración neuronal anormal ocurren antes de que se establezcan el resto de las malformaciones cerebrales. El epéndimo en uno de nuestros animales no tratados se encontraba denudado y sus áreas corticales cercanas presentaban profundas alteraciones organizativas. La respuesta astrogliar local confirmó que la denudación ependimaria no fue consecuencia de problemas relacionados con la técnica de fijación. El resto de los cerebros malformados presentaron preservación del epéndimo, sin embargo, ni procesos de reparación posteriores u otros cambios relacionados con proteínas de los filamentos pudieron ser estudiadas mediante las técnicas de histología básica usadas en este trabajo.

4. POSIBLES MECANISMOS DE HIDROCEFALIA EN EL MODELO Y SU PAPEL EN LOS HALLAZGOS CORTICALES

La hidrocefalia ha sido descrita asociada a ACII [122] y denudación endimaria [129]. En nuestro trabajo la hidrocefalia fue constante en los animales no tratados pero asociada o no a ACII y éste es un hallazgo que no había sido descrito hasta la fecha en el modelo quirúrgico.

- 1) Pequeños cambios en la presión hidrostática de del LCR pueden afectar al desarrollo del epéndimo. Este es un dato obtenido por distintos trabajos con ratones, en los cuales se comprobó también que la denudación endimaria es anterior al desarrollo de hidrocefalia [129].
- 2) Por otro lado también sabemos que la hidrocefalia en sí misma es capaz de producir displasia cortical y daño endimario [130,131] y quizás nuestro defecto fue creado demasiado tarde como para producir un daño endimario fácilmente observable con nuestras técnicas.
- 3) Otro posible mecanismo distinto a los anteriores se describe en el ratón mutante *Foxc1* que asocia disgenesia cortical. *Foxc1* se expresa únicamente en las leptomeninges en desarrollo y no en la corteza cerebral. El trabajo de Hecht [117] sugiere que el defecto inicial se origina en la pia y que *Foxc1* es necesario para reparar estos defectos. De manera que en ausencia de esta capacidad reparadora, la corteza es dismórfica por un exceso de migración de neuronas al espacio subaracnoideo a través de defectos de la pia. Sin embargo, defectos similares en la pia podrían ser también causados por la hidrocefalia en si misma.

Con los hallazgos encontrados en nuestro trabajo es muy difícil establecer el orden exacto de los acontecimientos; pero sin embargo, sí podemos sugerir que la pérdida de LCR probablemente produce una disrupción en el delicado equilibrio de presiones y factores de crecimiento o señalización. Esto podría alterar el correcto desarrollo del epéndimo y las meninges, incluso en estadios avanzados del desarrollo fetal, con las

consecuencias en el desarrollo cortical y ventricular descrito en humanos, y ahora también en el modelo quirúrgico.

Podemos también afirmar que, dadas las particularidades de nuestro modelo quirúrgico, la pérdida de LCR es el único insulto inicial posible y aun siendo relativamente tosco, es capaz de desencadenar malformaciones cerebrales complejas mediante vías independientes a las alteraciones genéticas descritas en la enfermedad.

Esto sin duda da fuerza al papel del daño secundario, progresivo y prevenible en la etiología del MMC.

5. MEJORÍAS NEUROCOGNITIVAS ALCANZADAS EN EL HUMANO MEDIANTE LA COBERTURA PRENATAL DEL DEFECTO LUMBAR

En términos de desarrollo neurocognitivo muy pocos pacientes con MMC tienen alteraciones graves. Las debilidades de la enfermedad en este sentido son: dificultades de lectura, de construcción espacial, atención, orientación y regulación del comportamiento [132].

Las habilidades cognitivas relacionadas con el lenguaje o reconocimiento de palabras mediadas por áreas frontales se encuentran preservados.

El cierre prenatal del defecto lumbar, revierte la herniación cerebelosa, reduce la necesidad de colocación de una válvula de derivación y mejora los resultados cognitivos en algunos niños [39,90,133].

Las etiologías de estas mejorías son aun controvertidas y precisaran de futuros estudios por parte del grupo MOMS. Si bien parecen encontrarse relacionadas con la disminución de las complicaciones relacionadas con las derivaciones VP o la hidrocefalia [88,134].

Recientemente, Danzer ha llevado a cabo un estudio con pacientes tratados mediante cirugía fetal en momentos previos al MOMS. Con un seguimiento medio de 10

años y mas de 50 pacientes, describió semejanzas con la población normal y mejorías en algunos escores de desarrollo cognitivo y ejecutivo en pacientes tratados mediante cirugía fetal [135].

Nuestros resultados describen cómo la pérdida de LCR en sí misma produce alteraciones en el desarrollo cerebral semejantes a las de la enfermedad humana, apoyando, por tanto, la importancia del cierre prenatal, y sugiriendo un efecto beneficioso independiente al de evitar complicaciones con las VDP.

En nuestro trabajo la vía más efectiva en este sentido fue la cirugía abierta que permitió el desarrollo cortical y disminuyó la incidencia de ACII e hidrocefalia, comparada con los resultados obtenidos con el resto de las técnicas.

El uso de pegamentos biológicos podría tener algunos efectos beneficiosos, sin embargo únicamente consiguió parte de los beneficios conseguidos mediante las otras técnicas. En humanos, las descripciones de técnicas fetoscópicas son cada vez mas frecuentes [94,97,98] y casi todas describen el uso de algún tipo de pegamento, pero no como único tratamiento sino formando parte de alguna técnica de cobertura más sólida.

6. TÉCNICAS FETOSCÓPICAS ACTUALES UTILIZADAS EN HUMANOS FRENTE A LAS USADAS EN EL MODELO QUIRÚRGICO

Todas las técnicas de cobertura prenatal del defecto en humanos se basan en el abordaje del defecto con o sin laparotomía, pero en todos los casos sin histerotomía [94,97,98,136]. Se usan un número variable de trócares y un medio gaseoso que suele ser CO₂. El CO₂ se ha asociado a acidosis fetal, si bien no parece tener grandes consecuencias clínicas tras ver las experiencias actuales [136].

Todos los autores utilizan distintas técnicas con parches con o sin suturas a las que se añaden distintos tipos de pegamentos.

Los resultados son variables en términos de ACII, prematuridad y respuesta motora. Son, en todos los casos, técnicas consideradas controvertidas entre los grupos que hacen cirugía abierta, dueños de la mayor evidencia disponible gracias a su estudio prospectivo y al seguimiento a largo plazo de sus pacientes [99].

Nosotros no pudimos sacar ninguna conclusión sólida en términos de corioamionitis y prematuridad. Sí concluimos, sin embargo, que el pegamento aislado es inferior a cualquier técnica en términos de ACII, hidrocefalia y desarrollo cortical. Otra conclusión obtenida fue que cualquier técnica fetoscópica distinta al pegamento debe ser considerada de extrema dificultad, con tiempos quirúrgicos largos y de difícil reproducción.

7. UTILIZACIÓN DE MEMBRANAS O MATRICES EN LA COBERTURA DEL DEFECTO LUMBAR EN EL MODELO QUIRÚRGICO

Aunque en este aspecto nuestras conclusiones fueron básicamente que el procedimiento se podía llevar a cabo, la novedad de la técnica fue doble. Por un lado, introdujimos el concepto del uso de las membranas con fibras alineadas, que teóricamente podrían permitir el crecimiento axonal a su través, y por otro lado, la utilización de una membrana en forma de canal que pudo colocarse en la región endimaria, quedando así dentro de la médula y adquiriendo el tejido neural una conformación anatómica semejante a la normal.

Pudimos ver que las membranas eran fáciles de utilizar y que el tiempo quirúrgico era semejante al del cierre sin usarlas. Por otro lado, en los estudios histológicos, éstas aparecieron bien integradas en el tejido subyacente sin estar encapsuladas.

El estudio mediante histología básica demostró que no había evidencia de infiltración leucocitaria o tejido fibroso en exceso que hubiéramos encontrado en el contexto de una gran respuesta inflamatoria local. Estos hallazgos podrían eliminar parte de las preocupaciones de su uso en humanos.

Este tipo de membranas han sido utilizadas con éxito en modelos animales de sección medular traumática; pueden favorecer la regeneración neural en médula y nervios periféricos y pueden hacer funciones temporales de matriz extracelular de células en proceso de regeneración, mediante la simulación de algunas de las propiedades del colágeno o tejido conectivo [109,137-139].

Si este mecanismo funcionara en nuestro entorno, la cirugía fetal abierta podría completarse con estas membranas que teóricamente podrían salvar la lesión glial establecida, o incluso ser usadas para permitir el transporte de distintas sustancias inmunomoduladoras que tuvieran un efecto beneficioso local [140-142].

Las terapias regenerativas son especialmente prometedoras por la particular inmunotolerancia y capacidad de regeneración del tejido fetal. De hecho, existen varios trabajos publicados en los que se usan distintos tipos de células madre con capacidad de producción de factores de crecimiento neural con efectos beneficiosos locales en este contexto [103,143], así como en las lesiones medulares del adulto [144].

En la aplicación prenatal, los trabajos mencionados inyectan las células en el tejido neural o en el líquido amniótico, aunque probablemente la vía más razonable de aplicación de este tipo de sustancias en el humano sea la de una membrana en íntimo contacto con el tejido dañado. Las razones son que la inyección en tejido neural fetal puede producir lesión en sí misma y la cantidad de líquido amniótico es tan grande en el humano que resulta difícil usar sustancias que, disolviéndose en él, puedan tener un efecto beneficioso local sobre una región pequeña.

8. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR EL EFECTO DEL CIERRE PRENATAL EN CUANTO A MOTILIDAD DE LAS EXTREMIDADES INFERIORES Y CONTINENCIA

La mejoría en la función urinaria o la motilidad de las extremidades inferiores en el *MOMS trial* ha sido menos llamativa que las mejorías cognitivas o de ACII [145].

En el MOMS el cierre prenatal se asoció con mayor capacidad de deambulación los 30 meses de edad corregida comparado con el cierre postnatal, y a mejoría clínica que se correspondía con dos niveles por debajo de lo esperable [90]. Estos datos han llevado a distintos autores a intentar mejorar el procedimiento prenatal mediante distintas vías que conduzcan a mejorar la capacidad motora distal.

Las primeras estrategias podrían basarse en el cierre precoz, aspecto que se encuentra muy limitado por la fragilidad tisular, pero que quizá avance con los nuevos procedimientos fescópicos.

Las siguientes estrategias podrían basarse en producir algún tipo de mejora local en el entorno de regeneración neural, en forma de sustancias inmunomoduladoras, células madre o membranas que, como hemos comentado en puntos anteriores, permitan el crecimiento axonal a través de ellas.

En el caso de las sustancias inmunomoduladoras el objetivo sería reducir la respuesta glial, y en el caso de las células madre, además, la producción de distintos factores neurotróficos que faciliten la regeneración neural.

Para el estudio en profundidad de cualquiera de estas vías serán necesarias dos herramientas:

- 1) La cuantificación mediante escalas de lesión neural del daño progresivo en las regiones expuestas.
- 2) La caracterización de objetivos sobre la respuesta glial en el MMC fetal.

9. CAMBIOS ESTRUCTURALES Y ESCALAS DE LESIÓN MEDULAR EN LA PLACA NEURAL Y REGIONES TORÁCICAS DEL MODELO TERATOGÉNICO

Diferentes autores describen por distintas vías cómo el daño de la placa neural empeora a medida que avanza la gestación. Esto se ha relacionado con la exposición

continúa al líquido amniótico, y a partir de la semana 34 también a la orina y al meconio. Este daño progresivo se define en el tejido neural por disrupción de la arquitectura de las astas posteriores y por la presencia de distintos cambios relacionados con la inflamación y gliosis y finalmente fibrosis y vacuolización [61,86].

Nuestras observaciones en este sentido coinciden con las previas y describen el efecto del daño secundario como un efecto dinámico, peor al final que al principio.

Encontramos también algunas áreas dañadas en regiones torácicas no expuestas al líquido amniótico; la explicación de estas regiones es más compleja. Quizá se deban simplemente a alteraciones secundarias a la manipulación; de cualquier manera, si estuvieran relacionadas con cambios malformativos, las alteraciones serían mínimas si las comparamos con las ejercidas por el daño secundario en las regiones que sí están expuestas al líquido.

En el modelo teratogénico encontramos poca mejoría en estas zonas relacionada simplemente con la cobertura prenatal. Es probable que el problema en este sentido se encuentre más relacionado con el modelo en sí mismo, en el que es muy difícil hacer procedimientos fetales efectivos antes del día 17, y en el que poco efecto puede ejercer la cobertura con una membrana quedando por delante únicamente 3 días de gestación. Algunos autores como Diogini, han descrito distintos grados de mejoría en el desarrollo del tejido neural en este mismo contexto tras inyectar células madre en el líquido amniótico [143], sin embargo al igual que nosotros, ningún otro autor ha descrito mejorías en este modelo simplemente cubriendo el defecto [146,147].

Nuestro mayor logro en este sentido es el de haber cuantificado por primera vez el daño de la región en modelo siguiendo una escala de lesión medular que incluya varios parámetros (hemorragia, vacuolización, gliosis...).

Esta observación no solo nos ha permitido describir el daño mediante una progresión cuantificable mediante histología básica con HE, sino que permitiría además, en futuros estudios, utilizar la misma herramienta para describir mejorías significativas relacionadas con distintas modalidades de tratamiento o cobertura.

Cuando estudiamos las astas dorsales con GFAP encontramos cierta mejoría relacionada con la cobertura con membrana. Las tinciones eran menos marcadas y había una preservación mayor de motoneurona. No pudimos cuantificar estos hallazgos por el escaso número de animales, pero las imágenes así los sugerían.

Otro hallazgo frecuente fue la presencia de una fina capa de tejido conectivo que cubría la zona expuesta en todos los animales en los que se puso membrana. Esto deberíamos interpretarlo como una respuesta inflamatoria local y un efecto negativo de la cobertura, al menos con este material (Policaprolactona).

10. EL PAPEL DE LA MIGROGLÍA EN EL DAÑO FETAL DEL TEJIDO NEURAL EXPUESTO EN EL MODELO TERATOGÉNICO

La microglía son macrófagos residentes locales del SNC. Cuando detectan tejido neural alterado expresan diferentes receptores que reconocen patógenos y otros factores liberados por las células dañadas [76,78,79].

En el tejido neural sano, la microglía se encuentra en un estado inactivo y presenta dentritas largas y finas. En respuesta al daño tisular, la microglía puede alterar su forma y adquirir aspecto ameboide con capacidad de migrar a las zonas afectadas [77].

La microglía se activa ante el daño del tejido neural producido por distintas causas (se trata de una activación poco específica). De hecho, la mayor parte de los modelos descritos que estudian su comportamiento se basan en el traumatismo (compresión, hemisección y contusión) [78].

La microglía activada libera mediadores proinflamatorios que contribuyen a la muerte neuronal a través de la vía del enzima NADPH.

El daño en el tejido neural fetal del MMC ha sido bien descrito, y aunque se trata de un daño crónico, los mecanismos de activación de la microglía deben de ser los

mismos. Hasta donde sabemos, la microglía nunca ha sido descrita en el la placa neural del MMC. En nuestro trabajo hemos podido describir su estabilidad en controles y su activación progresiva a los largo de la gestación en las regiones dorsales de las regiones expuestas en el MMC.

La actuación de la microglía durante un periodo de tiempo corto no debería ser dañina para el tejido, de hecho puede favorecer por distintas vías el crecimiento celular y axonal.

Sin embargo, su activación prolongada puede considerarse uno de los fenómenos más dañinos para el tejido neural, ya que la interacción entre tejido neural dañado de manera crónica y la microglía produce un círculo vicioso en el que se perpetúa y extiende la destrucción tisular de manera descontrolada. El final de este proceso es la demielinización, la degeneración axonal, la cavitación y la gliosis [78].

Diferentes sustancias han sido descritas reduciendo esta neurotoxicidad de la microglía como la minociclina y algunas citoquinas [148,149]. En nuestro trabajo la cobertura mediante matrices en el modelo teratogénico produjo respuesta microglial local cercana en regiones cercanas la matriz. Estas matrices tienen capacidad descrita para transportar distintas sustancias inmunomoduladoras así como células madre, lo que podría marcar la dirección de futuros trabajos. En nuestro trabajo actual no hemos podido describir beneficio únicamente con el uso de la membrana aislada. De hecho, una vez más, la utilización de este material (Policaprolactona) parece no solo aumentar de manera local la cantidad de tejido fibroso sino también la respuesta microglial.

11. LIMITACIONES DE NUESTRO TRABAJO

Los siguientes puntos que describimos, si bien no deben modificar nuestras conclusiones, si deben ser considerados en la interpretación de nuestros resultados y en las posibilidades de aplicación de las técnicas aquí descritas en la clínica.

Modelo de oveja

- 1) El modelo quirúrgico no reproduce el mecanismo etiopatogénico de la enfermedad humana. Aun siendo aparentemente un modelo fidedigno, es posible que existan en el humano alteraciones corticales producidas por distintos mecanismos de expresión genética que sean distintos a los de nuestro animal, y que no sean prevenibles por las vías que proponemos.
- 2) El modelo quirúrgico es difícil y costoso, lo que se traduce en que el número total de animales en las cuantificaciones sea escaso.
- 3) Las técnicas usadas en el modelo quirúrgico son de descripción anatómica e histología básica. Quizás técnicas más complejas de inmunohistoquímica de angiogénesis, apoptosis o la medida de factores de crecimiento en LCR, hubieran aportado datos a la etiología de la hidrocefalia o de las malformaciones corticales.
- 4) Fenómenos de bajo gasto fetal pueden tener efectos impredecibles sobre el desarrollo cerebral. En el modelo quirúrgico, durante la creación del defecto se exteriorizan los cuartos traseros del animal. El cordón queda en una localización intrauterina presumiblemente protegido de efectos compresivos de la pared del útero. El líquido amniótico se repone durante la cirugía en un intento de prevenir doblez o efectos tipo «kinking». La anestesia materna puede producir cuadros de hipotensión. Es muy difícil conocer el impacto de cualquiera de estos factores sobre nuestros hallazgos.

Modelo de rata

- 1) El modelo teratogénico no permite generalmente reproducir técnicas aplicables en el humano.
- 2) La activación de la microglía tiene un lado beneficioso en la regeneración neural en la médula espinal mediante remielinización. En el apartado Discusión

no debemos considerar su supresión con distintas sustancias o células como un éxito en todos los sentidos.

- 3) Existen otros marcadores útiles en el estudio del estado y la activación de la microglía, CD68 y MHCII, que podrían haber aportado información sin tener que hacer cuantificaciones basadas en el aspecto de la célula.
- 4) En los humanos, se ha descrito microglía de aspecto ameboide como una población normal transitoria durante la gestación. Nosotros no la hemos encontrado en el modelo y hemos medido proporciones de células activadas y no activadas, pero si existe esta población en el modelo teratogénico, puede haber influido en nuestra percepción de la reactividad de la microglía.

12. FUTURO DE LAS TÉCNICAS DE COBERTURA PRENATAL DEL MMC EN HUMANOS Y EN QUE SENTIDO PUEDEN SER INTERESANTES LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS

En la oveja hemos descrito alteraciones en el desarrollo cortical que, por el tipo de modelo, solo pueden ser explicados por la pérdida de LCR. En este sentido hemos añadido un dato más que sigue dando fuerza al daño secundario (prevenible mediante cirugía), frente al primario en la enfermedad, y que apoya los procedimientos de cobertura prenatal realizados en humanos.

Siguiendo la hipótesis de que la cobertura prenatal probablemente sea insuficiente para la recuperación de la médula, hemos aportado algunas bases para futuros trabajos: la utilización de matrices en el modelo quirúrgico y teratogénico que pueden transportar sustancias inmunomoduladoras, y dos objetivos cuantificables de estas posibles terapias, el daño medular progresivo (descrito mediante escalas) y la activación de la microglía, nunca antes descrita en este entorno.

Nuestros esfuerzos para realizar una cobertura fetoscópica nos han llevado a concluir que aunque más agresiva, únicamente la cirugía abierta con una sutura continua de la dura puede prevenir las malformaciones descritas aquí.

Actualmente distintas técnicas endoscópicas se usan en humanos con resultados variables, y ninguna todavía tiene la solidez en sus resultados del estudio prospectivo y del seguimiento a largo plazo del MOMS. Sin duda en el futuro estas técnicas endoscópicas se impondrán aunque quizás queda camino y refinamiento técnico.

Por último, la utilización de pegamentos que polimericen en líquido amniótico y puedan cubrir el defecto sin producir daño en el tejido neural y evitar la pérdida de LCR sería un gran avance. Actualmente, ningún producto puede cumplir estos objetivos, lo que sin duda nos acercaría a una cobertura precoz del tejido expuesto, probablemente mediante un procedimiento únicamente ecoguiado.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES PRINCIPALES

- 1) El modelo quirúrgico de MMC con pérdida fetal de LCR asocia hidrocefalia y alteraciones en el desarrollo cortical. Este dato da importancia al daño secundario o prevenible, y podría explicar alteraciones en el desarrollo cognitivo de la malformación distintas a las relacionadas con la hidrocefalia o la disfunción valvular.
- 2) En el modelo quirúrgico dichas alteraciones pueden prevenirse mediante distintos procedimientos prenatales, siendo el más efectivo el llevado a cabo mediante cirugía abierta con sutura de duramadre.
- 3) En el modelo teratogénico de MMC, la destrucción del tejido medular expuesto es progresiva y esta progresión es cuantificable.
- 4) En las astas posteriores del modelo teratogénico de MMC la microglía sufre una activación progresiva a lo largo de la gestación. Este dato sugiere daño tisular crónico y aporta un posible objetivo a futuros trabajos con sustancias inmunomoduladoras.

CONCLUSIÓN SECUNDARIA

En ambos modelos es posible añadir matrices transportadoras de sustancias o que favorezcan el crecimiento axonal a la cobertura lumbar fetal; el tipo de matriz determinará la respuesta inflamatoria y la fibrosis local.

VIII. RESUMEN

VIII. RESUMEN

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El MMC se asocia a malformaciones corticales cerebrales, hidrocefalia y malformación de ACII. Describir las mismas alteraciones en un modelo animal corregido prenatalmente aportaría datos sobre la etiología de las malformaciones y el beneficio del tratamiento fetal.

Los resultados positivos en humanos, en funcionalidad motora y continencia, mediante cirugía fetal son escasos, y mejorar el entorno de regeneración neural mediante sustancias o membranas podría optimizarlos. Por otro lado, establecer un método de cuantificación del daño tisular fetal y de la respuesta de los macrófagos medulares en este entorno, establecería objetivos para futuros tratamientos inmunomoduladores y/o regenerativos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo quirúrgico de oveja para el estudio del cerebro y de métodos de cobertura aplicables en humanos. Modelo teratogénico de rata para estudio de las bases del daño medular y de la respuesta inflamatoria local en este contexto.

RESULTADOS

El modelo quirúrgico de MMC presenta alteraciones corticales e hidrocefalia prevenibles mediante distintos procedimientos fetales, siendo el más efectivo el cierre del

defecto con sutura de duramadre. En el modelo quirúrgico es posible utilizar membranas con capacidad teórica de favorecer el desarrollo axonal que queden integradas en tejido medular. El modelo teratogénico presenta destrucción tisular y respuesta inflamatoria medular progresiva, siendo ésta cuantificable.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados dan fuerza al daño secundario o prevenible en la malformación y sugieren etiologías para las alteraciones cognitivas distintas a la hidrocefalia o la disfunción valvular.

Aportamos datos para futuros trabajos con sustancias que mejoren el entorno de regeneración medular mediante la descripción del uso de membranas y la cuantificación del daño tisular y la respuesta inflamatoria medular en este contexto.

IX. BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Muller, F. and R. O’Rahilly, *The primitive streak, the caudal eminence and related structures in staged human embryos*. Cells Tissues Organs, 2004. **177**(1): p. 2-20.
2. Ybot-Gonzalez, P. and A.J. Copp, *Bending of the neural plate during mouse spinal neurulation is independent of actin microfilaments*. Dev Dyn, 1999. **215**(3): p. 273-83.
3. McLone, D.G. and P.A. Knepper, *The cause of Chiari II malformation: a unified theory*. Pediatr Neurosci, 1989. **15**(1): p. 1-12.
4. Alvarez, I.S. and G.C. Schoenwolf, *Expansion of surface epithelium provides the major extrinsic force for bending of the neural plate*. J Exp Zool, 1992. **261**(3): p. 340-8.
5. Muller, F. and R. O’Rahilly, *The development of the human brain, the closure of the caudal neuropore, and the beginning of secondary neurulation at stage 12*. Anat Embryol (Berl), 1987. **176**(4): p. 413-30.
6. Desmond, M.E. and A.G. Jacobson, *Embryonic brain enlargement requires cerebrospinal fluid pressure*. Dev Biol, 1977. **57**(1): p. 188-98.
7. McLone, D.G. and M.S. Dias, *The Chiari II malformation: cause and impact*. Childs Nerv Syst, 2003. **19**(7-8): p. 540-50.
8. Sutton, L.N., et al., *Improvement in hindbrain herniation demonstrated by serial fetal magnetic resonance imaging following fetal surgery for myelomeningocele*. JAMA, 1999. **282**(19): p. 1826-31.
9. Smith, G.M. and B. Krynska, *Myelomeningocele: How we can improve the assessment of the most severe form of spina bifida*. Brain Res, 2015. **1619**: p. 84-90.
10. Frey, L. and W.A. Hauser, *Epidemiology of neural tube defects*. Epilepsia, 2003. **44 Suppl 3**: p. 4-13.
11. Canfield, M.A., et al., *Hispanic origin and neural tube defects in Houston/Harris County, Texas. I. Descriptive epidemiology*. Am J Epidemiol, 1996. **143**(1): p. 1-11.
12. Papp, C., et al., *Risk of recurrence of craniospinal anomalies*. J Matern Fetal Med, 1997. **6**(1): p. 53-7.
13. Shin, M., et al., *Prevalence of spina bifida among children and adolescents in 10 regions in the United States*. Pediatrics, 2010. **126**(2): p. 274-9.
14. Moretti, M.E., et al., *Maternal hyperthermia and the risk for neural tube defects in offspring: systematic review and meta-analysis*. Epidemiology, 2005. **16**(2): p. 216-9.

15. De-Regil, L.M., et al., *Effects and safety of periconceptional oral folate supplementation for preventing birth defects*. Cochrane Database Syst Rev, 2015(12): p. CD007950.
16. Wald, N.J., et al., *Blood folic acid and vitamin B12 in relation to neural tube defects*. Br J Obstet Gynaecol, 1996. **103**(4): p. 319-24.
17. van der Put, N.M., et al., *Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. **226**(4): p. 243-70.
18. Rothenberg, S.P., et al., *Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect*. N Engl J Med, 2004. **350**(2): p. 134-42.
19. Nau, H., *Valproic acid-induced neural tube defects*. Ciba Found Symp, 1994. **181**: p. 144-52; discussion 152-60.
20. Sukanya, S., et al., *Frontiers in research on maternal diabetes-induced neural tube defects: Past, present and future*. World J Diabetes, 2012. **3**(12): p. 196-200.
21. Mitchell, L.E., *Epidemiology of neural tube defects*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2005. **135C**(1): p. 88-94.
22. Windham, G.C., T. Bjerkedal, and L.E. Sever, *The association of twinning and neural tube defects: studies in Los Angeles, California, and Norway*. Acta Genet Med Gemellol (Roma), 1982. **31**(3-4): p. 165-72.
23. Yang, Y., et al., *Association between MTHFR C677T polymorphism and neural tube defect risks: A comprehensive evaluation in three groups of NTD patients, mothers, and fathers*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2015. **103**(6): p. 488-500.
24. Parle-McDermott, A., et al., *Confirmation of the R653Q polymorphism of the trifunctional C1-synthase enzyme as a maternal risk for neural tube defects in the Irish population*. Eur J Hum Genet, 2006. **14**(6): p. 768-72.
25. Boyd, P.A., et al., *Survey of prenatal screening policies in Europe for structural malformations and chromosome anomalies, and their impact on detection and termination rates for neural tube defects and Down's syndrome*. BJOG, 2008. **115**(6): p. 689-96.
26. Johnson, C.Y., et al., *Pregnancy termination following prenatal diagnosis of anencephaly or spina bifida: a systematic review of the literature*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2012. **94**(11): p. 857-63.
27. Wilson, R.D., et al., *Prenatal screening, diagnosis, and pregnancy management of fetal neural tube defects*. J Obstet Gynaecol Can, 2014. **36**(10): p. 927-42.
28. Norem, C.T., et al., *Routine ultrasonography compared with maternal serum alpha-fetoprotein for neural tube defect screening*. Obstet Gynecol, 2005. **106**(4): p. 747-52.
29. Racusin, D., et al., *Obesity and the risk and detection of fetal malformations*. Semin Perinatol, 2012. **36**(3): p. 213-21.

30. Cameron, M. and P. Moran, *Prenatal screening and diagnosis of neural tube defects*. Prenat Diagn, 2009. **29**(4): p. 402-11.
31. Gitlin, D., A. Perricelli, and G.M. Gitlin, *Synthesis of -fetoprotein by liver, yolk sac, and gastrointestinal tract of the human conceptus*. Cancer Res, 1972. **32**(5): p. 979-82.
32. Wang, Z.P., et al., *The effectiveness of prenatal serum biomarker screening for neural tube defects in second trimester pregnant women: a meta-analysis*. Prenat Diagn, 2009. **29**(10): p. 960-5.
33. Evans, M.I., et al., *Impact of folic acid fortification in the United States: markedly diminished high maternal serum alpha-fetoprotein values*. Obstet Gynecol, 2004. **103**(3): p. 474-9.
34. Wald, N., et al., *The effect of maternal weight on maternal serum alpha-fetoprotein levels*. Br J Obstet Gynaecol, 1981. **88**(11): p. 1094-6.
35. Reichler, A., et al., *Risk of anomalies as a function of level of elevated maternal serum alpha-fetoprotein*. Am J Obstet Gynecol, 1994. **171**(4): p. 1052-5.
36. Morrow, R.J., et al., *Prenatal diagnosis and management of anterior abdominal wall defects in the west of Scotland*. Prenat Diagn, 1993. **13**(2): p. 111-5.
37. Chao, H.C., *Magnetic resonance cholangiopancreatography in the evaluation of pediatric pancreaticobiliary diseases*. Pediatr Neonatol, 2011. **52**(6): p. 305-6.
38. Saleem, S.N., et al., *Fetal MRI in the evaluation of fetuses referred for sonographically suspected neural tube defects (NTDs): impact on diagnosis and management decision*. Neuroradiology, 2009. **51**(11): p. 761-72.
39. Adzick, N.S., *Prospects for fetal surgery*. Early Hum Dev, 2013. **89**(11): p. 881-6.
40. MacCarthy, P.A., et al., *Recurrence rates of neural tube defects in Dublin maternity hospitals*. Ir Med J, 1983. **76**(2): p. 78-9.
41. Akalan, N., *Myelomeningocele (open spina bifida) - surgical management*. Adv Tech Stand Neurosurg, 2011(37): p. 113-41.
42. McLone, D.G., *Care of the neonate with a myelomeningocele*. Neurosurg Clin N Am, 1998. **9**(1): p. 111-20.
43. Burke, R., G.S. Liptak, and D. Council on Children with, *Providing a primary care medical home for children and youth with spina bifida*. Pediatrics, 2011. **128**(6): p. e1645-57.
44. Nagler, J., J.A. Levy, and R.G. Bachur, *Stridor in an infant with myelomeningocele*. Pediatr Emerg Care, 2007. **23**(7): p. 478-81.
45. Dias, M.S. and D.G. McLone, *Hydrocephalus in the child with dysraphism*. Neurosurg Clin N Am, 1993. **4**(4): p. 715-26.
46. Rekate, H.L., *Shunt revision: complications and their prevention*. Pediatr Neurosurg, 1991. **17**(3): p. 155-62.

47. Luthy, D.A., et al., *Cesarean section before the onset of labor and subsequent motor function in infants with meningomyelocele diagnosed antenatally*. N Engl J Med, 1991. **324**(10): p. 662-6.
48. Rendeli, C., et al., *Latex sensitisation and allergy in children with myelomeningocele*. Childs Nerv Syst, 2006. **22**(1): p. 28-32.
49. Charney, E.B., J.B. Melchionni, and D.L. Antonucci, *Ventriculitis in newborns with myelomeningocele*. Am J Dis Child, 1991. **145**(3): p. 287-90.
50. McLone, D.G., *Technique for closure of myelomeningocele*. Childs Brain, 1980. **6**(2): p. 65-73.
51. Chakraborty, A., et al., *Toward reducing shunt placement rates in patients with myelomeningocele*. J Neurosurg Pediatr, 2008. **1**(5): p. 361-5.
52. Miller, P.D., et al., *Comparison of simultaneous versus delayed ventriculoperitoneal shunt insertion in children undergoing myelomeningocele repair*. J Child Neurol, 1996. **11**(5): p. 370-2.
53. Rocque, B.G., S. Lapsiwala, and B.J. Iskandar, *Ventricular shunt tap as a predictor of proximal shunt malfunction in children: a prospective study*. J Neurosurg Pediatr, 2008. **1**(6): p. 439-43.
54. Lehnert, B.E., et al., *Detection of ventricular shunt malfunction in the ED: relative utility of radiography, CT, and nuclear imaging*. Emerg Radiol, 2011. **18**(4): p. 299-305.
55. Matson, M.A., E.M. Mahone, and T.A. Zabel, *Serial neuropsychological assessment and evidence of shunt malfunction in spina bifida: a longitudinal case study*. Child Neuropsychol, 2005. **11**(4): p. 315-32.
56. Lindquist, B., et al., *Learning, memory and executive functions in children with hydrocephalus*. Acta Paediatr, 2008. **97**(5): p. 596-601.
57. McLone, D.G. and K. Zebracki, *Intelligence quotient in children with meningomyeloceles*. J Neurosurg, 2007. **106**(2 Suppl): p. 103-4; discussion 104-5.
58. Dennis, M. and M.A. Barnes, *The cognitive phenotype of spina bifida meningomyelocele*. Dev Disabil Res Rev, 2010. **16**(1): p. 31-9.
59. Holmbeck, G.N., et al., *A multimethod, multi-informant, and multidimensional perspective on psychosocial adjustment in preadolescents with spina bifida*. J Consult Clin Psychol, 2003. **71**(4): p. 782-96.
60. Meuli, M., et al., *In utero repair of experimental myelomeningocele saves neurological function at birth*. J Pediatr Surg, 1996. **31**(3): p. 397-402.
61. Meuli, M., et al., *The spinal cord lesion in human fetuses with myelomeningocele: implications for fetal surgery*. J Pediatr Surg, 1997. **32**(3): p. 448-52.
62. Piatt, J.H., Jr., *Treatment of myelomeningocele: a review of outcomes and continuing neurosurgical considerations among adults*. J Neurosurg Pediatr, 2010. **6**(6): p. 515-25.

63. Meuli, M., et al., *Creation of myelomeningocele in utero: a model of functional damage from spinal cord exposure in fetal sheep*. J Pediatr Surg, 1995. **30**(7): p. 1028-32; discussion 1032-3.
64. Diez-Pardo, et al., *Neural tube defects: an experimental model in the foetal rat*. Eur J Pediatr Surg, 1995. **5**(4): p. 198-202.
65. Friedrich, W.N., et al., *Cognitive abilities and achievement status of children with myelomeningocele: a contemporary sample*. J Pediatr Psychol, 1991. **16**(4): p. 423-8.
66. Casari, E.F. and A.G. Fantino, *A longitudinal study of cognitive abilities and achievement status of children with myelomeningocele and their relationship with clinical types*. Eur J Pediatr Surg, 1998. **8 Suppl 1**: p. 52-4.
67. von Koch, C.S., et al., *Myelomeningocele: characterization of a surgically induced sheep model and its central nervous system similarities and differences to the human disease*. Am J Obstet Gynecol, 2005. **193**(4): p. 1456-62.
68. Shim, I., et al., *Association of learning and memory impairments with changes in the septohippocampal cholinergic system in rats with kaolin-induced hydrocephalus*. Neurosurgery, 2003. **53**(2): p. 416-25; discussion 425.
69. Hwang, Y.S., I. Shim, and J.W. Chang, *The behavioral change of locomotor activity in a kaolin-induced hydrocephalus rat model: evaluation of the effect on the dopaminergic system with progressive ventricle dilatation*. Neurosci Lett, 2009. **462**(3): p. 198-202.
70. Korenromp, M.J., et al., *Early fetal leg movements in myelomeningocele*. Lancet, 1986. **1**(8486): p. 917-8.
71. Stiefel, D., A.J. Copp, and M. Meuli, *Fetal spina bifida in a mouse model: loss of neural function in utero*. J Neurosurg, 2007. **106**(3 Suppl): p. 213-21.
72. Barres, B.A., *The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease*. Neuron, 2008. **60**(3): p. 430-40.
73. Danzer, E., et al., *Amniotic fluid levels of glial fibrillary acidic protein in fetal rats with retinoic acid induced myelomeningocele: a potential marker for spinal cord injury*. Am J Obstet Gynecol, 2011. **204**(2): p. 178 e1-11.
74. Reis, J.L., et al., *In utero topographic analysis of astrocytes and neuronal cells in the spinal cord of mutant mice with myelomeningocele*. J Neurosurg, 2007. **106**(6 Suppl): p. 472-9.
75. Melo-Filho, A.A., et al., *Corticosteroids reduce glial fibrillary acidic protein expression in response to spinal cord injury in a fetal rat model of dysraphism*. Pediatr Neurosurg, 2009. **45**(3): p. 198-204.
76. Ransohoff, R.M. and V.H. Perry, *Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 119-45.

77. David, S. and A. Kroner, *Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(7): p. 388-99.
78. Loane, D.J. and K.R. Byrnes, *Role of microglia in neurotrauma*. Neurotherapeutics, 2010. **7**(4): p. 366-77.
79. Marin-Teva, J.L., et al., *Microglia and neuronal cell death*. Neuron Glia Biol, 2011. **7**(1): p. 25-40.
80. Golombeck, K., et al., *Maternal morbidity after maternal-fetal surgery*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **194**(3): p. 834-9.
81. Wilson, R.D., et al., *Reproductive outcomes after pregnancy complicated by maternal-fetal surgery*. Am J Obstet Gynecol, 2004. **191**(4): p. 1430-6.
82. Zamora, I.J., et al., *Maternal morbidity and reproductive outcomes related to fetal surgery*. J Pediatr Surg, 2013. **48**(5): p. 951-5.
83. Grande, C., et al., *[Creation of a model for myelomeningocele in rabbit embryos]*. Cir Pediatr, 2002. **15**(3): p. 101-6.
84. Fontecha, C.G., et al., *The effect of prenatal treatment with steroids and preterm delivery in a model of myelomeningocele on the rabbit foetus*. Pediatr Surg Int, 2007. **23**(5): p. 425-9.
85. Danzer, E., et al., *Morphologic analysis of the neuromuscular development of the anorectal unit in fetal rats with retinoic acid induced myelomeningocele*. Neurosci Lett, 2008. **430**(2): p. 157-62.
86. Danzer, E., et al., *Structural and functional characterization of bladder smooth muscle in fetal rats with retinoic acid-induced myelomeningocele*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(1): p. F197-206.
87. Tulipan, N., et al., *Effect of intrauterine myelomeningocele repair on central nervous system structure and function*. Pediatr Neurosurg, 1999. **31**(4): p. 183-8.
88. Tulipan, N., M. Hernanz-Schulman, and J.P. Bruner, *Reduced hindbrain herniation after intrauterine myelomeningocele repair: A report of four cases*. Pediatr Neurosurg, 1998. **29**(5): p. 274-8.
89. Sutton, L.N., N.S. Adzick, and M.P. Johnson, *Fetal surgery for myelomeningocele*. Childs Nerv Syst, 2003. **19**(7-8): p. 587-91.
90. Adzick, N.S., et al., *A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele*. N Engl J Med, 2011. **364**(11): p. 993-1004.
91. Brock, J.W., 3rd, et al., *Bladder Function After Fetal Surgery for Myelomeningocele*. Pediatrics, 2015. **136**(4): p. e906-13.
92. Peiro, J.L., et al., *Single-Access Fetal Endoscopy (SAFE) for myelomeningocele in sheep model I: amniotic carbon dioxide gas approach*. Surg Endosc, 2013. **27**(10): p. 3835-40.

93. Fontecha, C.G., et al., *Inert patch with bioadhesive for gentle fetal surgery of myelomeningocele in a sheep model*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009. **146**(2): p. 174-9.
94. Kohl, T., *Percutaneous minimally invasive fetoscopic surgery for spina bifida aperta. Part I: surgical technique and perioperative outcome*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2014. **44**(5): p. 515-24.
95. Graf, K., et al., *Percutaneous minimally invasive fetoscopic surgery for spina bifida aperta. Part III: neurosurgical intervention in the first postnatal year*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2016. **47**(2): p. 158-61.
96. Pedreira, D.A., et al., *Fetoscopic single-layer repair of open spina bifida using a cellulose patch: preliminary clinical experience*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2014. **27**(16): p. 1613-9.
97. Pedreira, D.A., et al., *Endoscopic surgery for the antenatal treatment of myelomeningocele: the CECAM trial*. Am J Obstet Gynecol, 2016. **214**(1): p. 111 e1-111 e11.
98. Peiro, J.L., et al., *Therapeutic indications of fetoscopy: a 5-year institutional experience*. J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 2009. **19**(2): p. 229-36.
99. Flake, A., *Percutaneous minimal-access fetoscopic surgery for myelomeningocele - not so minimal!* Ultrasound Obstet Gynecol, 2014. **44**(5): p. 499-500.
100. Saadai, P., et al., *Human induced pluripotent stem cell-derived neural crest stem cells integrate into the injured spinal cord in the fetal lamb model of myelomeningocele*. J Pediatr Surg, 2013. **48**(1): p. 158-63.
101. Wang, A., et al., *Placental mesenchymal stromal cells rescue ambulation in ovine myelomeningocele*. Stem Cells Transl Med, 2015. **4**(6): p. 659-69.
102. Feng, C., et al., *A comparison between placental and amniotic mesenchymal stem cells for transamniotic stem cell therapy (TRASCET) in experimental spina bifida*. J Pediatr Surg, 2016. **51**(6): p. 1010-3.
103. Dionigi, B., et al., *Trans-amniotic stem cell therapy (TRASCET) minimizes Chiari-II malformation in experimental spina bifida*. J Pediatr Surg, 2015. **50**(6): p. 1037-41.
104. Hunter, J.G., L. Swanstrom, and K. Thornburg, *Carbon dioxide pneumoperitoneum induces fetal acidosis in a pregnant ewe model*. Surg Endosc, 1995. **9**(3): p. 272-7; discussion 277-9.
105. Paek, B.W., et al., *Hindbrain herniation develops in surgically created myelomeningocele but is absent after repair in fetal lambs*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **183**(5): p. 1119-23.
106. Louw, G.J., *The development of the sulci and gyri of the bovine cerebral hemispheres*. Anat Histol Embryol, 1989. **18**(3): p. 246-64.
107. Evans, H.E. and W.O. Sack, *Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references*. Zentralbl Veterinarmed C, 1973. **2**(1): p. 11-45.

108. Smart, I.H. and G.M. McSherry, *Gyrus formation in the cerebral cortex in the ferret. I. Description of the external changes*. J Anat, 1986. **146**: p. 141-52.
109. Zhu, Y., et al., *Nanofibrous Patches for Spinal Cord Regeneration*. Adv Funct Mater, 2010. **20**(9): p. 1433-1440.
110. Lu, Q., et al., *Nanofibrous architecture of silk fibroin scaffolds prepared with a mild self-assembly process*. Biomaterials, 2011. **32**(4): p. 1059-67.
111. Ehrlich, M., et al., *Memantine for prevention of spinal cord injury in a rabbit model*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1999. **117**(2): p. 285-91.
112. Follis, F., et al., *Gangliosides and spinal cord ischemia secondary to aortic cross-clamping in the rat model*. J Surg Res, 1995. **58**(6): p. 702-6.
113. Deren, K.E., et al., *Reactive astrocytosis, microgliosis and inflammation in rats with neonatal hydrocephalus*. Exp Neurol, 2010. **226**(1): p. 110-9.
114. Barkovich, A.J., et al., *A developmental and genetic classification for malformations of cortical development*. Neurology, 2005. **65**(12): p. 1873-87.
115. Siegenthaler, J.A., et al., *Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation*. Cell, 2009. **139**(3): p. 597-609.
116. Zarbalis, K., et al., *Cortical dysplasia and skull defects in mice with a Foxc1 allele reveal the role of meningeal differentiation in regulating cortical development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(35): p. 14002-7.
117. Hecht, J.H., et al., *Primary cellular meningeal defects cause neocortical dysplasia and dyslamination*. Ann Neurol, 2010. **68**(4): p. 454-64.
118. Richman, D.P., et al., *Mechanical model of brain convolutional development*. Science, 1975. **189**(4196): p. 18-21.
119. Van Essen, D.C., *A tension-based theory of morphogenesis and compact wiring in the central nervous system*. Nature, 1997. **385**(6614): p. 313-8.
120. Juranek, J., et al., *Neocortical reorganization in spina bifida*. Neuroimage, 2008. **40**(4): p. 1516-22.
121. Dennis, M., et al., *Neurobiology of perceptual and motor timing in children with spina bifida in relation to cerebellar volume*. Brain, 2004. **127**(Pt 6): p. 1292-301.
122. Gilbert, J.N., et al., *Central nervous system anomalies associated with meningomyelocele, hydrocephalus, and the Arnold-Chiari malformation: reappraisal of theories regarding the pathogenesis of posterior neural tube closure defects*. Neurosurgery, 1986. **18**(5): p. 559-64.
123. Pinar, H., N. Tatevosyants, and D.B. Singer, *Central nervous system malformations in a perinatal/neonatal autopsy series*. Pediatr Dev Pathol, 1998. **1**(1): p. 42-8.

124. Glenn, O.A. and A.J. Barkovich, *Magnetic resonance imaging of the fetal brain and spine: an increasingly important tool in prenatal diagnosis, part 1*. AJNR Am J Neuro-radiol, 2006. **27**(8): p. 1604-11.
125. de Wit, O.A., et al., *Pathogenesis of cerebral malformations in human fetuses with meningocele*. Cerebrospinal Fluid Res, 2008. **5**: p. 4.
126. Rodriguez, E.M., *The cerebrospinal fluid as a pathway in neuroendocrine integration*. J Endocrinol, 1976. **71**(3): p. 407-43.
127. Sarnat, H.B., C.L. Trevenen, and H.Z. Darwish, *Ependymal abnormalities in cerebro-hepato-renal disease of Zellweger*. Brain Dev, 1993. **15**(4): p. 270-7.
128. Sarnat, H.B., *Role of human fetal ependyma*. Pediatr Neurol, 1992. **8**(3): p. 163-78.
129. Jimenez, A.J., et al., *A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse*. J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(11): p. 1105-19.
130. Lawson, R.F. and A.J. Raimondi, *Hydrocephalus-3, a murine mutant: I. Alterations in fine structure of choroid plexus and ependyma*. Surg Neurol, 1973. **1**(2): p. 115-28.
131. Humphreys, P., et al., *Focal cerebral mantle disruption in fetal hydrocephalus*. Pediatr Neurol, 2007. **36**(4): p. 236-43.
132. Fletcher, J.M., et al., *Spinal lesion level in spina bifida: a source of neural and cognitive heterogeneity*. J Neurosurg, 2005. **102**(3 Suppl): p. 268-79.
133. Johnson, M.P., et al., *Maternal-fetal surgery for myelomeningocele: neurodevelopmental outcomes at 2 years of age*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **194**(4): p. 1145-50; discussion 1150-2.
134. Bruner, J.P., et al., *Fetal surgery for myelomeningocele and the incidence of shunt-dependent hydrocephalus*. JAMA, 1999. **282**(19): p. 1819-25.
135. Danzer, E., et al., *Long-term neurofunctional outcome, executive functioning, and behavioral adaptive skills following fetal myelomeningocele surgery*. Am J Obstet Gynecol, 2016. **214**(2): p. 269 e1-8.
136. Kohl, T., et al., *Amniotic air insufflation during minimally invasive fetoscopic fetal cardiac interventions is safe for the fetal brain in sheep*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **128**(3): p. 467-71.
137. Patel, S., et al., *Bioactive nanofibers: synergistic effects of nanotopography and chemical signaling on cell guidance*. Nano Lett, 2007. **7**(7): p. 2122-8.
138. Chew, S.Y., et al., *Aligned Protein-Polymer Composite Fibers Enhance Nerve Regeneration: A Potential Tissue-Engineering Platform*. Adv Funct Mater, 2007. **17**(8): p. 1288-1296.
139. Kim, Y.T., et al., *The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps*. Biomaterials, 2008. **29**(21): p. 3117-27.

140. Cao, H., T. Liu, and S.Y. Chew, *The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(12): p. 1055-64.
141. Watanabe, M., et al., *A tissue engineering approach for prenatal closure of myelomeningocele with gelatin sponges incorporating basic fibroblast growth factor*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(5): p. 1645-55.
142. Fauza, D.O., et al., *Neural stem cell delivery to the spinal cord in an ovine model of fetal surgery for spina bifida*. Surgery, 2008. **144**(3): p. 367-73.
143. Dionigi, B., et al., *Partial or complete coverage of experimental spina bifida by simple intra-amniotic injection of concentrated amniotic mesenchymal stem cells*. J Pediatr Surg, 2015. **50**(1): p. 69-73.
144. Vaquero, J., et al., *An approach to personalized cell therapy in chronic complete paraplegia: The Puerta de Hierro phase I/II clinical trial*. Cytotherapy, 2016. **18**(8): p. 1025-36.
145. Adzick, N.S., *Fetal surgery for spina bifida: past, present, future*. Semin Pediatr Surg, 2013. **22**(1): p. 10-7.
146. Watanabe, M., et al., *A tissue engineering approach for prenatal closure of myelomeningocele: comparison of gelatin sponge and microsphere scaffolds and bioactive protein coatings*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(7-8): p. 1099-110.
147. Watanabe, M., A.G. Kim, and A.W. Flake, *Tissue engineering strategies for fetal myelomeningocele repair in animal models*. Fetal Diagn Ther, 2015. **37**(3): p. 197-205.
148. Lopez-Vales, R., et al., *FK 506 reduces tissue damage and prevents functional deficit after spinal cord injury in the rat*. J Neurosci Res, 2005. **81**(6): p. 827-36.
149. Stirling, D.P., et al., *Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury*. J Neurosci, 2004. **24**(9): p. 2182-90.

El modelo de mielomeningocele en oveja presenta alteraciones cerebrales semejantes a las del humano y estas pueden ser prevenidas mediante cirugía fetal abierta

J.L. Encinas, M Germani, A. Luis, C Soto, F. Pederiva, L.F. Avila, M.A. García-Cabezas*, J.L. Peiró**, C.G. Fontecha**, R. Rodríguez***, M. López-Santamaría, J.A. Tovar

*Departamento de Cirugía Pediátrica, *Departamento de Anatomía Patológica. Hospital La Paz, Madrid. **Servicio de Cirugía Pediátrica. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. ***Servicio de Obstetricia. Hospital La Paz, Madrid.*

RESUMEN

Objetivo. Describir malformaciones cerebrales en el modelo de mielomeningocele (MMC) en oveja que pudieran asociarse a las alteraciones cognitivas observadas en humanos y determinar si algún tipo de abordaje prenatal es capaz de prevenirlas.

Métodos. Realizamos un MMC fetal en 33 ovejas preñadas entre los días 60 y 80. En 15 casos el defecto no fue corregido (grupo A); en 10 fue corregido mediante cirugía fetal abierta (grupo B); en 5 mediante cobertura fetoscópica con pegamento biológico (grupo C); y en 3 mediante la aplicación fetoscópica de un parche de sustituto de dura. Los cráneos y cerebros fueron examinados externamente y en cortes coronales. Buscamos hidrocefalia, alteraciones en la migración neuronal y malformación de Arnold-Chiari tipo II (AC-II) mediante H&E, Masson y el marcador neural S-100. Cuatro corderos sanos sirvieron de control.

Resultados. Siete animales en el grupo A (46%), 5 en el grupo B (50%), 2 en el C (40%) y 1 en el D (33%) nacieron a término mediante cesárea. Los del grupo A presentaron alteraciones en la migración neuronal, hidrocefalia y AC-II, no observadas en el grupo B o en los controles. Los cerebros del grupo C no presentaron hidrocefalia ni alteraciones en la migración, pero sí dilatación del cuarto ventrículo y un grado menor de herniación cerebelosa. En este grupo, las raíces nerviosas del defecto se encontraban cubiertas por una capa continua de material fibroso.

Conclusiones. El modelo de MMC en oveja presenta alteraciones en el desarrollo cerebral que podrían corresponderse con algunas de las alteraciones cognitivas de la enfermedad humana. La cobertura abierta puede prevenirlas completamente y la fetoscópica con pegamento parcialmente.

PALABRAS CLAVE: Mielomeningocele; Fetal; Oveja; Desarrollo neuronal; Cerebro.

Correspondencia: José Luis Encinas Hernández. Departamento de Cirugía Pediátrica. Hospital La Paz. Paseo de la Castellana, 281. 28046 Madrid. E-mail: encinas.j@tiscali.it

Jose Luis Encinas tiene un contrato de investigación PFSE del FIS. Federica Pederiva tiene un contrato de investigación de la CAM. Este trabajo ha sido subvencionado por la Fundación Mutua Madrileña y el Fondo de Investigación Sanitaria.

Trabajo presentado en el XLVII congreso de la SECP. 20 de Mayo 2009.

Recibido: Mayo 2009

Aceptado: Marzo 2010

PRENATAL TECHNIQUES TO PREVENT CENTRAL NERVOUS SYSTEM MALFORMATIONS IN THE SURGICALLY INDUCED MODEL OF MYELOMENINGOCELE

ABSTRACT

Aim. To describe central nervous system malformations in the surgically induced model of Myelomeningocele (MMC) and their prevention using different prenatal treatments.

Methods. MMC was surgically created in 33 fetal lambs. Fifteen did not undergo fetal repair (group A). Of the lambs that did undergo repair, 10 were repaired with open two layer surgical closure (group B), 5 with fetoscopic coverage using biogluce (group C) and 3 fetoscopically using a patch (group D). All procedures were recorded and lamb brains and spinal cords were examined grossly and microscopically in coronal sections for structural organization anomalies. Histopathological changes were assessed using HE and S-100 neural marker.

Results. Hydrocephalus, Arnold-Chiari type II (AC-II) malformation and some neuronal migration disorders were observed in group A. Brains from group B and D were not hydrocephalic and had neither cell migration disorders nor hindbrain herniation. Group C presents mild degrees of hydrocephalus and AC-II. In group C lumbar lesion was covered by fibrous tissue.

Conclusions. Some of the central nervous system abnormalities observed in human disease are present in the surgically induced model of MMC. In this model avoidance of fluid drainage using open fetal surgery limits malformation severity.

KEY WORDS: Myelomeningocele; Cortex; Gyral; Development; Brain.

INTRODUCCIÓN

El mielomeningocele (MMC) asocia varias alteraciones en el desarrollo neuronal cerebral bien descritas por trabajos anatomopatológicos y radiológicos. Estas malformaciones suelen ser: hidrocefalia de ventrículos laterales y tercer ventrículo, disgenesia de cuerpo calloso, alteraciones en la migración neuronal y malformación de Arnold-Chiari tipo II (AC-II)^(1,2).

Estas malformaciones se relacionan con algunas alteraciones cognitivas, también bien conocidas, asociadas a la

enfermedad generalmente en forma de déficits no verbales⁽³⁾.

En el modelo de MMC en la oveja, han sido estudiadas principalmente la funcionalidad de las extremidades inferiores y la anatomía medular. También han descrito varios autores el AC-II y su corrección mediante cirugía fetal abierta^(4,5). Sin embargo, únicamente un estudio había centrado sus esfuerzos en el desarrollo neuronal cerebral del modelo fuera de las ya conocidas alteraciones de fosa posterior⁽⁶⁾.

En humanos, los datos preliminares de cobertura prenatal del defecto mediante cirugía fetal abierta se asocian a una mejoría de la conformación de cerebro y cerebelo y a una disminución a la mitad de la necesidad de colocación de una válvula de derivación ventrículo-peritoneal⁽⁷⁻⁹⁾.

Los problemas de la cirugía fetal abierta son el oligohidramnios y el parto pretérmino⁽¹⁰⁾, tratando de evitarlos autores de todo el mundo, han intentado simplificar la técnica de cobertura facilitando así su corrección endoscópica⁽¹¹⁻¹³⁾.

No existe ningún estudio experimental que enfrente los resultados sobre el desarrollo neuronal cerebral de la cirugía fetal abierta y de distintas técnicas endoscópicas en un modelo de MMC.

Nuestro objetivo fue describir si el modelo de MMC en oveja presenta alteraciones en el desarrollo neuronal cerebral que pudieran relacionarse con las alteraciones cognitivas descritas en el humano y el posible efecto beneficioso sobre estas de distintos tipos de cobertura prenatal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las ovejas preñadas fueron trasladadas a nuestras instalaciones una semana antes de la cirugía con acceso libre a comida y agua hasta las últimas 24 horas previas a la intervención. En todos los casos realizamos un estudio ecográfico que confirmara y datara la gestación. Las ovejas fueron intubadas y anestesiadas con Propofol (10 mg/kg) e Isoflurano 2-2,5% con oxígeno a 2 L/min. El dolor postoperatorio fue diagnosticado mediante cambios en el comportamiento y la marcha y tratado con parches de Fentanilo.

La creación del defecto ha sido descrita previamente^(4,5) y consiste en la realización de una laminectomía lumbar bilateral con apertura de la duramadre seguida de una mielotomía media. La longitud total del defecto fue de unos 3 cm.

Realizamos el defecto en 33 animales entre las semanas 60 y 80 de gestación; en 15 casos este no fue corregido prenatalmente (grupo A); en 10 el defecto fue corregido mediante cirugía fetal abierta con dos suturas continuas de dura y piel (grupo B); en 5 mediante la aplicación fetoscópica percutánea de un pegamento biológico (grupo C); y en 3 mediante la sutura de un sustituto de duramadre derivado del Gore-tex (Duragen®) y abordaje fetoscópico con tres puertos (grupo D).

La técnica fetoscópica de aplicación del pegamento no había sido descrita y se realizó mediante abordaje percutá-



Figura 1.

neo con control ecográfico usando un único trocar Cook (Check-Flo Introducer Set. Cook. RCF 10.0 38-J) compatible con una óptica Storz de 2 mm (11530 AA. Kart Storz). El pegamento sintético usado fue Cosseal® (Baxter) y se introdujo de manera percutánea a través de una aguja de veress con la punta cortada (Fig. 1). La técnica percutánea con tres trócares ha sido previamente descrita y se realizó con puertos de 3 mm fijados a la pared con balones de Fogarty introducidos a través de Abocaths paralelos a los puertos⁽¹⁴⁾. Posteriormente, se suturó un parche ovoideo de Duragen® sobre el defecto usando una sutura monofilamento no absorbible. Posteriormente los bordes fueron sellados con pegamento biológico pasando la aguja de veress a través de uno de los trócares. En los dos tipos de abordaje fetoscópico utilizamos Helio conectado a un insuflador de laparoscopia Storz, ya que el uso de CO₂ en fetoscopia puede asociarse a acidosis fetal⁽¹⁵⁾.

Las gestaciones continuaron hasta el día 140. Los corderos vivieron durante las primeras 24 horas durante las que se estudió la presencia de alteraciones en la marcha y seguidamente fueron sacrificados y perfundidos con Paraformaldehído al 7%.

Los corderos fueron decapitados y el sistema nervioso central (SNC) extraído en un bloque cerebro-medula. Los cráneos fueron explorados externamente y seccionados en su línea media en busca de malformación de ACII, descrita como tejido cerebelar bajo el foramen mágnium. Los cerebros fueron seccionados en su línea media y se tomaron fotografías de sus planos laterales y sagitales para posterior estudio de alteraciones groseras en la migración celular e hidrocefalia. El hemisferio cerebral izquierdo fue seccionado en cortes coronales de medio centímetro desde la comisura blanca anterior en sentido ventral y dorsal. Los bloques fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes de 6 µm que fueron teñidos con H-E, Masson y el marcador neuronal S-100. Cuatro animales sanos sirvieron como controles.

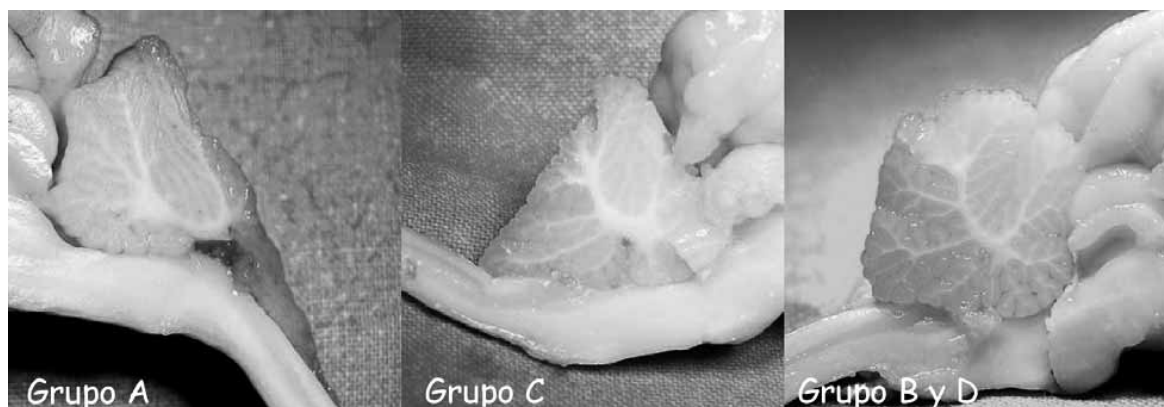


Figura 2. Grupo A: presencia de AC-II. Grupo C: grado intermedio de AC-II. Grupos B y D: ausencia de AC-II.

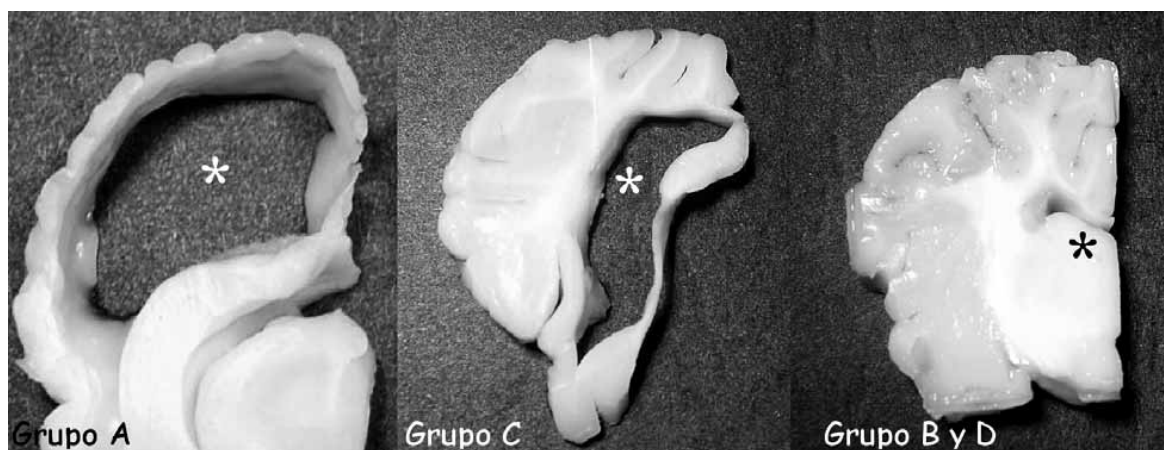


Figura 3. Grupo A: gran hidrocéfalo en ventrículos laterales. Grupo C: grado intermedio de hidrocéfalo en ventrículos laterales. Grupos B y D: ausencia de hidrocéfalo.

RESULTADOS

Diez y ocho animales murieron durante la gestación (18/33; 54%) con dos casos de muerte materna (2/33; 6%), lo que supone una mortalidad fetal y materna semejante a la descrita previamente por otros autores (4-6).

Siete animales en el grupo A (7/15; 46%), 5 en el grupo B (5/10; 50%), 2 en el grupo C (2/5; 60%) y 1 en el D (1/3; 33%) (n.s.) nacieron a término entre los días 140 y 145 de gestación. Las muertes en el grupo D fueron, en ambos casos, intraoperatorias por sangrado tras colocación percutánea de los puertos.

El tiempo del procedimiento en el grupo B fue de 40 min. \pm 11, en el grupo C de 40 min \pm 8 y en el D de 240 min \pm 41.

Aspecto del defecto y clínica

En el momento del cierre del defecto (en los grupos B y C) y al nacimiento en el grupo A, el MMC presentaba un

aspecto semejante al de la enfermedad humana, estando formado por una fina capa que contenía líquido y tejido nervioso medular abierto en su línea media. Clínicamente, los animales del grupo A eran parapléjicos, incontinentes para la orina y presentaban hipotrofia de su cuartos traseros y diversas anomalías ortopédicas en forma de artrogriposis y escoliosis graves. Ninguno de los animales presentaba alteraciones craneales groseras, siringomiela o quistes cuádrigéminos.

Malformación de Arnold-Chiari tipo II

Cuatro animales del grupo A (4/7; 57%) presentaron malformación de AC-II no observada en ninguno de los animales de los grupos B, D o en los controles. Los animales del grupo C presentaron en un caso AC-II en un grado menor que el observado en el grupo A (Fig. 2).

Hidrocéfalo y alteraciones en la migración neuronal

En los animales de grupo A existía hidrocéfalo (Fig. 3) y alteraciones en la migración neuronal en forma de adelgaza-

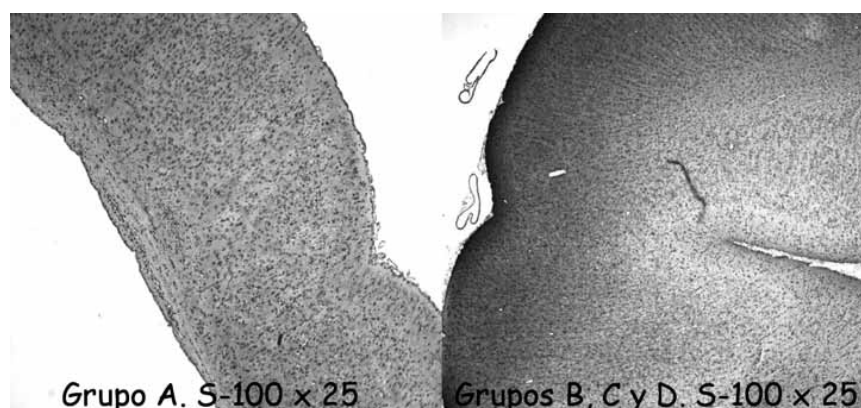


Figura 4. Grupo A: trastornos en la migración neuronal. Pérdida de estructura y adelgazamiento cortical con denudación endimaria. Grupos B, C y D: estructura cortical normal.

miento cortical temporal y pérdida de la estructura habitual (Fig. 4).

En algunas regiones, el epéndimo había desaparecido bruscamente y eran las regiones adyacentes a estas las que presentaban un mayor grado de alteración estructural (Fig. 4). También en el grupo A existían zonas de adelgazamiento del cuerpo calloso observadas únicamente en sus porciones posteriores.

Los animales del grupo C presentaban ligera hidrocefalia de los ventrículos laterales y uno de ellos una llamativa dilatación del tercer ventrículo no acompañada de alteraciones microscópicas en el tejido adyacente o estenosis en el acueducto de Silvio.

Ninguno de los animales del grupo B, D o los controles presentaron hidrocefalia, alteraciones corticales ni otras alteraciones en la migración neuronal.

Defecto lumbar

A término, los defectos lumbares en el grupo A se encontraban abiertos con grados variables de cierre espontáneo que no llegó a ser total en ningún caso. Los animales del grupo B presentaban el defecto completamente cerrado con un crecimiento normal de piel y anejos sobre él, mientras que en los animales del grupo C macroscópicamente el defecto se encontraba completamente abierto, aunque en los estudios microscópicos con H-E se pudo comprobar que existía una fina capa continua de tejido fibroso que cubría las raíces nerviosas. El animal del grupo D presentaba el defecto cerrado por completo.

DISCUSIÓN

Alteraciones en el desarrollo cerebral del modelo

Existe evidencia radiológica y anatomopatológica de la existencia de anomalías en el desarrollo neuronal cerebral en pacientes con MMC. Entre estas malformaciones se encuentran: hidrocefalia de ventrículos laterales y del tercer ventrículo, alteraciones en la migración neuronal, adelgazamiento cor-

tical temporal, disgenesia del cuerpo calloso, polimicrogiria y alteraciones en la conformación cerebelar y de la fosa posterior^(1,2).

Todas estas malformaciones han sido relacionadas por otras publicaciones con las alteraciones cognitivas particulares de los niños con MMC, descritas generalmente en forma de déficits de atención u orientación así como déficits cognitivos no verbales^(3,16,17).

El modelo de MMC en oveja presenta similitudes con la enfermedad humana en forma de paraplejia e incontinencia urinaria, así como malformación de AC-II y lesiones histológicas medulares semejantes^(4,5).

Von Koch, del grupo de tratamiento prenatal de San Francisco, realizó en el año 2005 el único estudio hasta esa fecha que buscaba alteraciones en el desarrollo neuronal cerebral del modelo. No encontró hidrocefalia y las alteraciones cerebrales estaban limitadas a trastornos en la densidad axonal en un tracto nervioso particular relacionado con la fimbria⁽⁶⁾. Sus hallazgos en cuanto a AC-II fueron muy semejantes a los descritos previamente por la literatura⁽¹⁸⁻²⁰⁾. La principal limitación de este estudio fue quizá el pequeño número de animales. Nuestro grupo ha publicado recientemente algunas malformaciones cerebrales en el modelo que sugerían una similitud mayor con la enfermedad que las descritas por von Koch; sin embargo, el número de animales fue también muy reducido⁽²¹⁾.

Los animales con defecto no corregido de nuestro estudio actual mostraron alteraciones en el desarrollo neuronal cerebral, semejantes a las descritas en las series humanas: hidrocefalia de ventrículos laterales y tercer ventrículo, alteraciones en la migración neuronal, disgenesia de cuerpo calloso y AC-II.

La etiología de la malformación de AC-II y de la hidrocefalia es controvertida. Algunas teorías localizan su origen en alteraciones en la conformación de la fosa posterior que impiden la correcta circulación de líquido cefalorraquídeo (LCR)⁽²²⁾. Otras más recientes describen la existencia de una denudación endimaria inicial que destruye la matriz germinal y modifica la absorción de LCR y precede a toda la cascada malformativa^(23,24).

En el modelo de oveja hemos podido comprobar la existencia de alteraciones en la migración celular cortical asociadas a áreas extensas de denudación endimaria sin AC-II o estenosis del acueducto de Silvio. El número de animales es reducido y no podemos establecer ninguna conclusión sólida en este sentido; sin embargo, nuestros hallazgos sugieren que la denudación endimaria en este caso tuvo un papel inicial al describirse aislada y sin otra razón que explicara la presencia de hidrocefalia.

Nuestros hallazgos en el modelo en cuanto a AC-II son semejantes a los del resto de las publicaciones y son cercanos al 43% descrito por von Koch⁽⁶⁾. Los animales dentro del grupo de no corregidos que no presentaron AC-II tenían el defecto lumbar parcialmente cubierto o, en cualquier caso, de tamaño menor que los defectos abiertos y grandes que presentaban los animales con AC-II; hallazgo semejante al descrito por Meuli^(4,5) y que sugiere que la pérdida continua de LCR es un factor determinante en su desarrollo.

Eficacia de las distintas técnicas de cobertura prenatal del defecto

Meuli describió en sus primeros trabajos que la cobertura prenatal del defecto en el modelo mediante cirugía fetal abierta producía una reducción significativa del AC-II y cierta mejoría funcional en las extremidades inferiores, medida mediante potenciales evocados^(4,5). Von Koch no encontró diferencias significativas en el desarrollo axonal cerebral entre los animales corregidos y los no corregidos⁽⁶⁾.

En nuestro grupo, los animales corregidos mediante cirugía fetal abierta no mostraron alteraciones cerebrales significativas y, de hecho, fueron indistinguibles en todos los aspectos del grupo control.

Los animales corregidos mediante la técnica de cobertura percutánea con pegamento presentaron lesiones de gravedad intermedia. En estos casos no encontramos alteraciones de la migración neuronal pero sí hidrocefalia de los ventrículos laterales y dilatación del tercer ventrículo, pequeños cambios displásicos en los plexos coroideos y grados menores de AC-II. Esto sugiere que el pegamento cubre el defecto de manera efectiva durante un período de tiempo limitado, disminuyendo las consecuencias sobre el desarrollo cerebral de la pérdida de LCR, pero no previniéndolas por completo. El procedimiento es sencillo y con poco riesgo de sangrado.

La cobertura con tres trócares y una plancha de Duragen es considerablemente más compleja. El abordaje percutáneo con 3 puertos en un animal con cotiledones dispersos por la cavidad uterina multiplica el riesgo de sangrado, que fue la causa principal de muerte en este grupo. La cobertura en sí misma también es laboriosa y larga. Los resultados del grupo D, aunque semejantes a los de la cirugía fetal abierta, son cuestionables al existir un único superviviente. Los potenciales beneficios de las técnicas percutáneas en cuanto a disminución del parto pretérmino o mortalidad fetal no han podido ser establecidos probablemente por el pequeño tamaño de la muestra.

Este trabajo completa en parte los resultados preliminares publicados por nuestro grupo, sugiriendo con más solidez que algunas de las malformaciones cerebrales observadas en la enfermedad humana pueden deberse únicamente a la pérdida de LCR, quizá debido a modificaciones en la concentración de sus factores de crecimiento. Si esto es así, la cobertura prenatal del defecto estaría indicada, siendo el cierre completo mediante cirugía fetal abierta el procedimiento más efectivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hutchins GM, Meuli M, Meuli-Simmen C, Jordan MA, Heffez DS, Blakemore KJ. Acquired spinal cord injury in human fetuses with myelomeningocele. *Pediatr Path Lab Med*. 1996; 16: 701-2.
2. Juranek J, Fletcher J, Hasan K, Breier J, Cirino P, Pazo-Alvarez P, Diaz J, Ewing-Cobbs E, Dennis M, Papanicolaou A. Neocortical organization in spina bifida. *Neuroimage*. 2008; 40: 1516-1522.
3. Fletcher JM, Copeland K, Frederick JA, Blaser SE, Kramer LA, Northrup H, Hannay HJ, Brandt ME, Francis DJ, Villareal G, Drake JM. Spinal lesion level in spina bifida: a source of neural and cognitive heterogeneity. *J Neurosurg*. 2005; 102: 268-79.
4. Meuli A, Simmen C, Hutchins GM. In utero surgery neurologic function at birth in sheep with spina bifida. *J Pediatr Surg*. 1995; 30: 342-7.
5. Meuli M, Meuli-Simmen C, Yingling CD, Hutchins GM, Seller M, Harrison MR, Adkizt M. Creation of myelomeningocele in utero. A model of functional damage from spinal cord: exposure in fetal sheep. *J Pediatr Surg*. 1995; 30: 1028-32.
6. von Koch C, Compagnone N, Shinjiro H, Suzzane Y, Harrison M, Farmer D. Myelomeningocele: characterization of a surgically induced sheep model and its central nervous system similarities and differences to the human disease. *Am J Obst Gynecol*. 2005 193: 1456-62.
7. Tulipan N, Hernanz-Schulman M, Bruner JP. Reduced hindbrain herniation after intrauterine myelomeningocele repair, a report of four cases. *Pediatr Neurosurg*. 1998; 29: 274-8.
8. Bruner JP, Tulipan L, Paschall RL. Fetal surgery for myelomeningocele and the incidence of shunt-dependent hydrocephalus. *JAMA*. 1999; 282: 1819-25.
9. Jonsson M, Gerdes M, Rintoul N, Pasquariello P, Melchionni J, Sutton L, Adzick S. Maternal-fetal surgery for myelomeningocele: neurodevelopmental outcomes at 2 years of age. *Am J Obst Gynecol*. 2006 194: 1145-52.
10. Longaker MT, Gobus MS, Filly RA, Rosen MA, Chang SW, Harrison MR. Maternal outcome after fetal surgery. *JAMA*. 1991; 265: 737-41.
11. Bruner JP, Richar WO, Tulipan NB, Arney TL. Endoscopic coverage of myelomeningocele in utero. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 180: 153-8.
12. Kohl T, Hartlage MG, Kiehlitz D, Westphal M, Buller T, Achenbach S, Aryee S, Gembruch U, Brentrup A. Percutaneous fetoscopic patch coverage of experimental lumbosacral full-thickness skin lesions in sheep. *Surg Endoscop*. 2003; 23: 24-28.
13. Bruner JP, Tulipan NB, Richards WO, Walsh WF, Boehm FH, Vrabec EK. In utero repair of myelomeningocele: a comparison of endoscopy and hysterotomy. *Fetal Diagn Ther*. 2000; 15: 83-8.

14. Khol T. Percutaneous fetal access and uterine closure for fetoscopic surgery. Lessons learned from 16 consecutive procedures in pregnant sheep. *Surg Endoscop*. 1997; 11: 819-824.
15. Gratacos E, Deprest JA. Effects of amniodistention with carbon dioxide on fetal acid-base status during fetoscopic surgery in a sheep model. *Surg Endoscop*. 2001; 15: 368-72.
16. Maureen D, Edelstein K, Hetherington R, Copeland K, Frederick J, Blaser S, Kramer L, Drake J, Brandt M, Fletcher J. Neurobiology of perceptual and motor timing in children with spina bifida in relation to cerebellar volume. *Brain*. 2004; 127: 1292-1301.
17. Shim I, Ha Yoon, Young J, Lee HJ, Yang K, Chang J. Association of learning and memory impairments with changes in the septohippocampal cholinergic system in rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Neurosurg*. 2003; 53: 416-424.
18. Jennigs RW, Wilkinson C, Westerberg B. Chiari malformation develops in surgically created myelomeningocele and its prevented by repair of the myelomeningocele in fetal lambs. *Am J Obstet Gynecol*. 2006; 41: 11-13.
19. Peak BW, Farmer DL, Wilkinson CC, Albanese CT, Peakock W, Harrison MR. Hindbrain herniation develops in surgically created myelomeningocele but is absent after repair in fetal lambs. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183: 1119-23.
20. Bouchard S, Davey MG, Rintoul NE, Walsh DS, Rorke LB, Adzick NS. Correction of hindbrain herniation and anatomy of the vermis after in utero repair of myelomeningocele in sheep. *J Podiatry Surg*. 2003; 38: 451-8.
21. Encinas Hernández JL, Soto C, García-Cabezas MA, Pederiva F, Garriboli M, Rodríguez R, Peiró JL, Carceller F, López-Santamaría M, Tovar JA. Brain malformations in the sheep model of myelomeningocele are similar to those found in human disease. *Pediatr Surg Int*. 2008; 24: 1335-40.
22. McLone DG. The cause of Chiari II malformation: a unified theory. *Pediatr Neurosci*. 1989; 15: 1-12.
23. de Wit O, den Dunnen W, Sollie K, Iris R, Meiners L, Brouwer O, Rodriguez E, Silval D. Pathogenesis of cerebral malformations in human fetuses with myelomeningocele. *Cer Fluid Res*. 2008; 5: 4.
24. Jimenez AJ, Tome M, Wagner C, Rodriguez S, Fernández-Llebrez, Rodriguez EM, Pérez-Figares JM. A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; 60: 1105-119.
25. Rodriguez EM. The cerebrospinal fluid as a pathway in neuroendocrine integration. Review. *J Endocrinol*. 1976; 71: 407-4.

Pediatr Surg Int (2008) 24:1335–1340
DOI 10.1007/s00383-008-2276-8

ORIGINAL ARTICLE

Brain malformations in the sheep model of myelomeningocele are similar to those found in human disease: preliminary report

Jose Luis Encinas Hernández · C. Soto · M. A. García-Cabezas · F. Pederiva ·
M. Garriboli · R. Rodríguez · J. L. Peiró · F. Carceller · M. López-Santamaría ·
J. A. Tovar

Published online: 7 November 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract

Purpose To examine if brain malformations, similar to those which account for cognitive disorders seen in human disease, are present in an ovine model of myelomeningocele (MMC).

Methods An MMC-like lesion was surgically created in 16 fetal lambs between 60 and 80 days of gestation. Ten did not undergo fetal repair (group A), 2 were repaired with an open two-layer closure (group B), 2 with open biogluce coverage (group C) and 2 with fetoscopic coverage (group D). Lambs were killed and their brains were examined. Two brains from normal unoperated lambs served as controls.

Results Thirteen lambs died in utero (81%). Two lambs in group A and 1 in group B were delivered at term. Group A brains showed hydrocephalus and extensive areas of polymicrogyria. There was also an extensive denudation of the ependymal lining under the polymicrogyric areas and the corpus callosum was thinner than normal. No hindbrain herniation was observed. Brains from group B and the control did not show any of these abnormalities.

Conclusions Some of the central nervous system abnormalities associated to MMC in human patients are also found in the uncorrected fetal lamb model of MMC but not in the only survivor to intrauterine coverage. Further studies are necessary to ascertain if these abnormalities can be prevented by coverage of the defect.

J. L. Encinas Hernández (✉) · C. Soto · F. Pederiva ·
M. López-Santamaría · J. A. Tovar
Department of Pediatric Surgery, Hospital Universitario
“La Paz”, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain
e-mail: encinas.j@tiscali.it

M. A. García-Cabezas
Service of Pathology, Hospital Universitario
“Príncipe de Asturias”, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

M. Garriboli
Service of Pediatric Surgery, Ospedale Policlinico di Milano,
Milan, Italy

R. Rodríguez
Service of Obstetrics, Hospital Universitario “La Paz”,
Madrid, Spain

J. L. Peiró
Service of Pediatric Surgery, Hospital Universitario
“Vall D’Hebron”, Barcelona, Spain

F. Carceller
Service of Neurosurgery, Hospital Universitario “La Paz”,
Madrid, Spain

Keywords Myelomeningocele · Fetal · Sheep ·
Brain · Development

Abbreviations

MMC Myelomeningocele
AC-II Arnold Chiari type II
CSF Cerebral spinal fluid

Introduction

Myelomeningocele (MMC), a neural tube closure defect, is the most common congenital malformation of the central nervous system. Depending on the level, MMC results in variable lower extremity motor or sensory defects, neurogenic bladder, fecal incontinence and skeletal malformations [1]. Some patients develop type II, Arnold-Chiari malformation (AC-II) and hydrocephalus with variable degree of mental impairment [1–3]. Midgestational

fetal coverage of the spinal defect has shown promising results in animal models minimizing damage to developing central nervous system [4–13]. Some behavioral and non-verbal cognitive defects have been described in association with MMC. These cognitive defects could be explained through brain malformations related to hydrocephalus and cell migration disorders [14–18]. The fetal lamb MMC model has been mainly used for examining limb motor defects [19] and hindbrain herniation [20]. The investigation of associated brain malformations could further enlighten the benefits for prenatal coverage and also allow in-depth knowledge of the similarities between the human disease and the ovine model. The aim of this report, a part from a more extensive investigation of the developmental changes associated with different modalities of prenatal repair of the MMC in fetal lambs, was to describe in this model the previously unreported brain malformations similar to those found in patients with MMC that might account for cognitive and behavioral disorders.

Materials and methods

Pregnant ewes were delivered 1 week before the intervention and housed in an appropriate establishment with free access to food and water except for the 24 h preceding the intervention. Prior to anesthesia, ultrasound was used to confirm pregnancy, to determine the number of and position fetuses and gestational age. Each ewe was positioned supine, intubated, anesthetized with Propofol (10 mg/kg) and maintained with isoflurane 2–2.5% in oxygen 2 l/min. Postoperative pain was assessed with observation of changes in posture, locomotor activity and alimentary behavior, and treated with a trans-dermal Fentanyl patch.

An MMC-like lesion was surgically created in 16 fetal lambs between day 60 and 80 of gestation. A midline maternal laparotomy and, as previously described [21, 22], bilateral and lower lumbar laminectomy was performed in the fetus, followed by a middle myelotomy (with dura opening) until leakage of cerebral spinal fluid (CSF) was observed. The 16 fetuses were divided into four groups. Ten lambs (10/16, 62%) did not undergo fetal repair (group A). A group of 2 (12%), underwent open surgical repair on day 100th (group B). To additional groups of 2 (12%) received either open bioglue coverage (group C) or percutaneous fetoscopic coverage using bioglue or patch (group D). Only survivors in groups A and B form the basis of the present report.

Fetuses were allowed to go to term (day 140) and were delivered vaginally, they were killed within 24 h and perfused with 4% paraformaldehyde. The lambs were decapitated and a spine sample was removed. Lamb skulls

were hemisected on the midline looking for hindbrain herniation as defined by cerebellar tissue below the foramen magnum. The skull was examined looking for lacunar malformations. Brains were dissected and removed from the skull, weighed and postfixed 24 h in 4% paraformaldehyde. Brains were hemisected in the midline and photographs were taken from the convexity and the mid-plane (Nikon® D40X 10 Mpixel camera). The cortical surface was examined looking for migration defects. Each hemisphere was sectioned in the coronal plane to obtain 1 cm-thick blocks; the first coronal section passed through the anterior white commissure.

The presence of hydrocephalus was assessed and photographs were taken. Blocks were embedded in paraffin and 6 µm sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin.

Results

Thirteen lambs died in utero (13/16, 81%) with three maternal deaths (3/16, 19%). This mortality is higher than that in previous reports, due to the relatively high maternal mortality and also to the intrinsic tendency of the model to the preterm labor [21, 22]. Two mothers died 3 and 4 days after surgery due to pulmonary infection refractory to antibiotics, related to gastric aspiration during anesthetic induction. Another maternal death was related to an unsuccessful result of the percutaneous coverage. Two lambs in group A (2/10, 20%) and 1 in group B (1/2, 50%) were delivered at term.

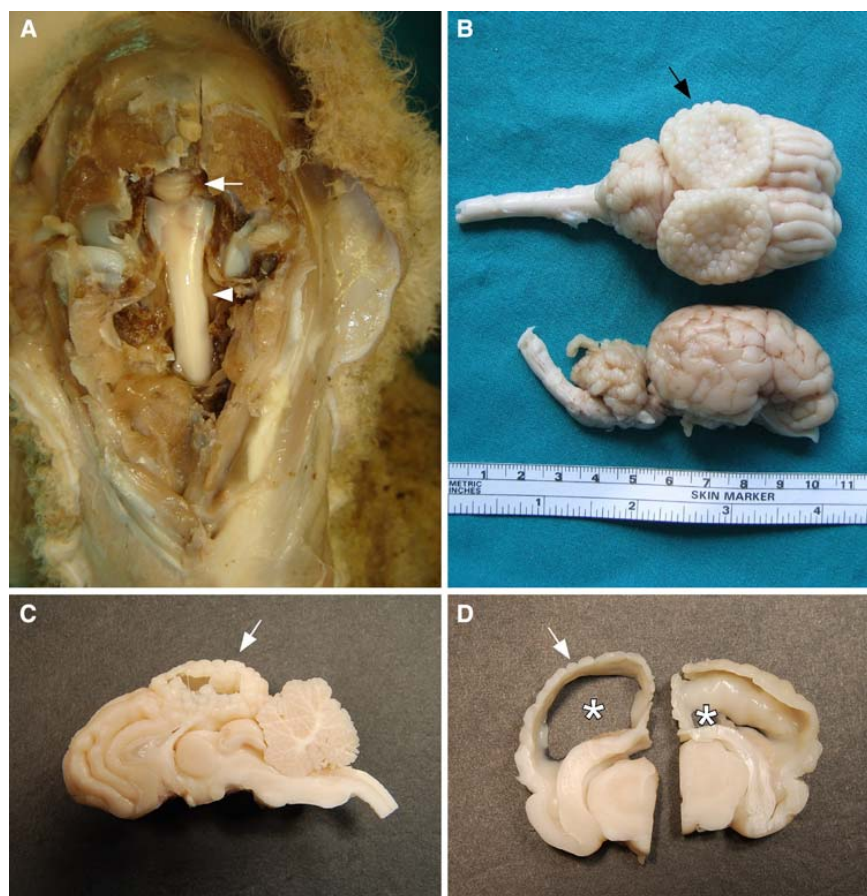
Clinical findings

At the time of MMC coverage (day 100), lesions had lumbar cystic sacs containing abnormal spinal cord tissue on the dorsal aspect, similar to the malformation observed in humans. At term (day 140), the two survivors from group A presented quite nice healing of the defect without any CFS leak. Clinically, these two animals without prenatal correction were incontinent for urine and showed flaccid paraplegia, muscular hypotrophy and absent reflexes. The animal from group B did not show paraplegia or decreased muscle mass.

Pathological findings

At term (day 140) no significant hindbrain herniation was observed in any animal (Fig. 1a). None of the lambs (born at term or miscarried) had evidence of syringomyelia, quadrigeminal cyst, split cranial sutures or lueckenschadel. Brains from group A showed hydrocephalus and extensive areas of polymicrogyria in the posterior portions

Fig. 1 Pathology findings (macroscopic). In **a** the posterior fossa of the skull of a lamb from group A is exposed; there are no signs of hindbrain herniation (*white arrow* points the vermis and *white arrowhead* points the spinal cord). **b** shows the central nervous system of a lamb from group A (*up*) and a control case (*down*); group A brain shows extensive areas of polymicrogyria (*black arrow*) in the posterior portions of the cerebral hemispheres mostly affecting the parietal, occipital and temporal lobes; the frontal lobes, the cerebellum and the brain stem are grossly normal. A medial view of the same case in the upper portion of **b** can be seen in **c**; polymicrogyric areas in the parietal and occipital lobe also affect their medial aspects (*white arrow*); the diencephalon, the cerebellum and the brainstem are grossly normal, but the posterior portion of the corpus callosum is thinner than the anterior. **d** shows two coronal sections of the same brain from group A depicted in **b** and **c**; the lateral ventricles are very enlarged (*white asterisk*) and the polymicrogyric neocortex is very thin (*white arrow*)



of the cerebral hemispheres (Fig. 1b–d). There was also a reduced cortical thickness in temporal, parietal and occipital regions but there was an apparently normal development of frontal regions (Fig. 1b, c). Microscopically polymicrogyric areas consisted of a thin and undulating ribbon made of multiple mini-convolutions with only a molecular layer under the meninges and a neuronal layer fused between adjacent mini-convolutions (Fig. 2a). Some mini-convolutions radiated out like fingers and others blanch, and fused producing submerged gyri. There were also some glioneuronal heterotopias in the meninges.

The ependymal lining was lost in extensive areas under the polymicrogyric tissue. Rests of the germinal matrix were found under the surviving ependyma (Fig. 2b). There was an abrupt transition between the denudated areas and those still covered by ependyma (Fig. 2b). Glial tissue was directly in contact with CFS in denudated areas. The posterior portions of the corpus callosum were gliotic and considerable thinner than the anterior portions under the

frontal lobes (Fig. 2c); these lobes did not show polymicrogyria and the ependymal lining was preserved.

Finally, the brainstem and cerebellum were normal. The aqueduct of Sylvius and the IV ventricle were covered by ependyma and the subcommissural organ was normal.

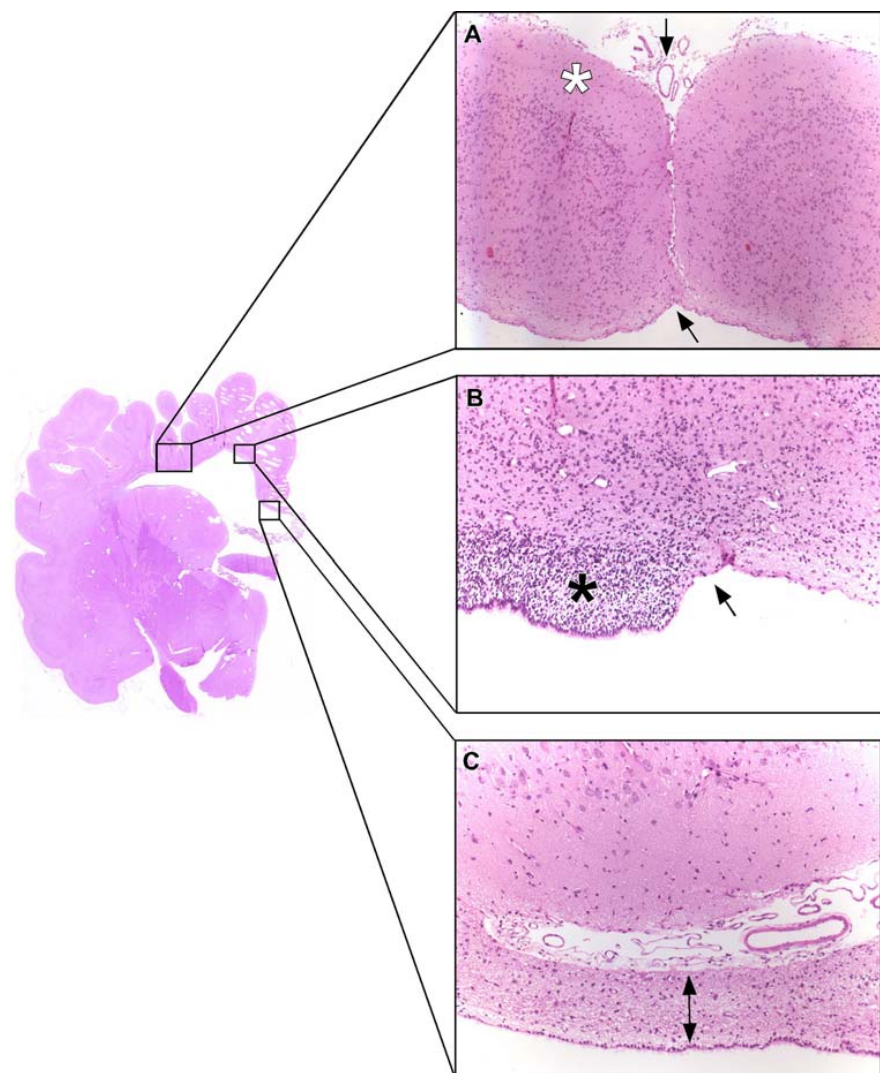
The brain from group B was not hydrocephalic. Neither cell migration disorders nor hindbrain herniation were observed. None of those changes were found in the control brains, either.

Discussion

Hydrocephalus, ependymal denudation and migration disorders

There are two main hypotheses for explaining the initial hydrocephalus in MMC; extreme crowding of contents of the posterior fossa that impedes egress of CSF from the subarachnoid space [1, 23–25], and a primary ependymal

Fig. 2 Pathology findings (microscopic). A whole coronal section from a brain of group A stained with hematoxylin and eosin is shown on the left; midline is to the right and the cerebral convexity is to the left. The inset in *a* shows a microscopic view of a polymicrogyric area where the cortex has a molecular layer (white asterisk) and a non-layered neuronal zone below. Micro-convolutions seem to fuse close to meningeal vessels that introduce themselves in the brain parenchyma (upper black arrow). The ependymal lining is lost (black arrow in the bottom). The inset in *b* shows rests of the subependymal germinal matrix (black asterisk) covered by ependyma; there is an abrupt transition between the areas covered by ependyma and those areas denuded (black arrow). The inset in *c* is a coronal section of the corpus callosum under the polymicrogyric areas that is thinner than normal (double black arrow)



denudation leading to communicating hydrocephalus [26]. Ependymal denudation has been described in human fetal hydrocephalus, but it is not clear if this was its cause or result. It was generally thought that the ependymal denudation was a consequence of the increased intraventricular pressure [27, 28]. However, studies with *hyh* mutant mice have shown that the primary defect preceding hydrocephalus resides in the ependymal cell lineage. Ependymocytes detach and follow a progressive ependymal denudation and this effect may also involve a subcommissural organ dysfunction that has been closely related to the development of hydrocephalus [25].

Recently, a study based on human fetuses with MMC described an ependymal denudation preceding hydrocephalus and AC-II malformation suggesting that this

ependymal denudation would account for the loss of progenitor cells and impairment of CSF restoration with implications for cell proliferation and migration [29–31].

Our animal model shows extensive areas of ependymal denudation, a considerable hydrocephalic brain, clear disorders of cortical development, and completely open aqueduct without hindbrain herniation. The strong statistical association in human disease between hydrocephalus and AC-II suggests a common developmental pathway that several theories have tried to explain [23, 24]; no assumption could be made about the complex origin of AC-II and more animals are necessary to analyze this fact. On the other hand, anatomical proximity between cell migration disorders and areas of denuded ependyma and the presence of hydrocephalus in the absence of AC-II

suggests that this ependymal denudation could have had an initial appearance in the malformative developmental sequence.

Hindbrain herniation

Hindbrain herniation was not found in any animal, differently from previous reports Paek (100%) [32], Bouchard (85%) [33] and von Koch (43%) [34]. Perhaps the most remarkable fact is the absence of this herniation in presence of hydrocephalus, suggesting that hydrocephalus may have a previous origin non-related to AC-II. Again, more animals are necessary to analyze this fact. An early MMC creation is feasible preventing defect healing, allowing a longer CSF leak and perhaps improving possibilities for herniation of cerebellar tissue below the foramen magnum. It is probable that our lesions were smaller than expected and, as was observed, they were healed in utero before hindherniation could appear.

Cortical and corpus callosum thinning: human cognitive defects

The finding of a spectrum of posterior cerebral mantle thinning has already been described in humans in association with hydrocephalus [27, 31]. Recently, a radiological study, using quantitative MRI, has described an overall reduction in white matter and an increased neocortical thickness in the frontal regions of children with MMC [35]. Parietal, temporal and occipital cortical thinning have been observed in the non-corrected brains of our study; frontal regions seemed to be even more prominent than healthy brains, and parietal areas were particularly reduced, varying from mild thinning to virtual absence. These regional patterns correlate in our model with underlying hydrocephalus so perhaps thinning could be associated with its mechanical effects. In terms of neurobehavioral outcomes relatively few children with MMC sustain severe mental retardation; weakness involves reading, spatial construction skills, attention, orientation and engagement, and behavioral regulation. Since cognitive skills involving language and word recognition are mediated by neuronal networks that involve the frontal regions, preservation of these skills may reflect the greater reliance on frontal components of these networks, as has already been described in humans by some radiological publications [14–16, 35].

In addition, the reduction in temporal or occipital white matter and callosal dysgenesis, as occurred in our non-corrected brains, has been observed in human MMC [1, 24]. This particular group of malformations, probably related to chronic hydrocephalus, has been associated with attention,

orientation and another non-verbal skills, some of the well documented cognitive weakness observed in children with MMC.

Intrauterine repair of MMC: developmental brain implications

von Koch in 2005, working with the surgically induced sheep MMC model, described some axonal tract degeneration on the fimbria-forniceal pathway suggesting an influence of the MMC-like defect in brain axonal development. No polymicrogyria, subependymal gray matter heterotopia or differences in head circumference were found in her study.

She also observed no significant differences in axonal development between corrected and non-corrected groups [34].

The MMC sheep model is an injury model that is not supposed to reproduce the brain developmental changes of the human disease. As von Koch notes [34], the sheep model only partially resembles MMC in order to the absence of hydrocephalus, polymicrogyria and subependymal gray matter heterotopia. Our small sample size limits the reliability of our results; the neurodevelopmental malformations we have observed in the MMC model suggests that human brain abnormalities, could be produced at least partially by prenatal CSF leakage, perhaps related to changes in fluid restoration or imbalances in the CFS neural progenitor population. In this case, prenatal coverage of the leak, may improve brain development.

As far as we know, this is the first description of these malformations in the MMC-like lamb model. No firm assumption can be made about the complex origin of hydrocephalus or AC-II malformation and further results with larger samples than this preliminary group will be needed.

It would be interesting to determine in further studies the presence of ependymal denudation at different gestational stages.

Our findings suggest a stronger resemblance of the ovine MMC-like model to human disease and encourage the continuing work on diverse procedures of prenatal repair.

Acknowledgments This study was supported by FIS 07/0827 (Fondo de Investigación Sanitaria) and by FMM 2007 (Fundación Mutua Madrileña). Federica Pederiva is a research fellow of CAM (Comunidad Autónoma de Madrid). Thanks to Dr. Carmen Cavada for giving us access to the microscopes and microcameras of the Department of Anatomy, Histology and Neuroscience of the School of Medicine of the Universidad Autónoma de Madrid. We also thank Drs. Francisco Hernández, Laura Burgos and all medical residents of our department for assistance with sheep surgeries; and Delia Aguado, Luis Javier Ruiz-Morote, Mariana de Abreu, and Dr. Carlota Largo for superb veterinary care.

References

- Grosfeld JL, O'Neill JA, Fonkalsrud EW, Coran AG (2006) Pediatric surgery. Elsevier, Mosby, pp 1987–2002
- Hutchins GM, Meuli M, Meuli-Simmen C, Jordan MA, Heffez DS, Blakemore KJ (1996) Acquired spinal cord injury in human fetuses with myelomeningocele. *Pediatr Path Lab Med* 16:701–702
- Juliá V, Sancho M, Albert A, Conill J, Martínez A, Grande C, Morales L (2006) Prenatal covering of the spinal cord decreases neurologic sequelae in a myelomeningocele model. *J Pediatr Surg* 41:1125–1129
- Tulipan N, Hernanz-Schulman M, Bruner JP (1998) Reduced hindbrain herniation after intrauterine myelomeningocele repair, a report of four cases. *Pediatr Neurosurg* 29:274–278
- Bruner JP, Tulipan L, Paschall RL (1999) Fetal surgery for myelomeningocele and the incidence of shunt-dependent hydrocephalus. *JAMA* 282:1819–1825
- Heffez DS, Aryanpur J, Hutchins GM (1990) The paralysis associated with myelomeningocele. Experimental data implicating a preventable spinal cord injury. *Neurosurg* 26:987–992
- Jonsson M, Gerdes M, Rintoul N, Pasquariello P, Melchionni J, Sutton L, Adzick S (2006) Maternal-fetal surgery for myelomeningocele: neurodevelopmental outcomes at 2 years of age. *Am J Obstet Gynecol* 194:1145–1152
- Difederico EM, Burlingame JM, Kilpatrick SJ, Harrison MR, Mattay MA (1998) Pulmonary edema in obstetric patients rapidly resolved except in the presence of infection or of nitroglycerin tocolysis after open fetal surgery. *Am J Obstet Gynecol* 179:925–933
- Longaker MT, Gobus MS, Filly RA, Rosen MA, Chang SW, Harrison MR (1991) Maternal outcome after fetal surgery. *JAMA* 265:737–741
- DiFiderico EM, Harrison MR, Matthey MA (1996) Pulmonary edema in a woman following fetal surgery. *Chest* 109:1114–1117
- Bruner JP, Richar WO, Tulipan NB, Arney TL (1999) Endoscopic coverage of myelomeningocele in utero. *Am J Obstet Gynecol* 180:153–158
- Kohl T, Hartlage MG, Kiehlitz D, Westphal M, Buller T, Achenbach S, Aryee S, Gembruch U, Brentup A (2003) Percutaneous fetoscopic patch coverage of experimental lumbosacral full-thickness skin lesions in sheep. *Surg Endoscop* 23:24–28
- Bruner JP, Tulipan NB, Richards WO, Walsh WF, Boehm FH, Vrabcak EK (2000) In utero repair of myelomeningocele: a comparison of endoscopy and hysterotomy. *Fetal Diagn Ther* 15:83–88
- Maureen D, Edelstein K, Hetherington R, Copeland K, Frederick J, Blaser S, Kramer L, Drake J, Brandt M, Fletcher J (2004) Neurobiology of perceptual and motor timing in children with spina bifida in relation to cerebellar volume. *Brain* 127:1292–1301
- Haynes R, Borestein N, Desilva T, Folkert R, Lena L, Volpe J, Kinney H (2005) Axonal development in the cerebral white matter of the human fetus and infant. *J Comp Neurol* 484:156–167
- Shim I, Yoon Ha, Young J, Lee HJ, Yang K, Chang J (2003) Association of learning and memory impairments with changes in the septohippocampal cholinergic system in rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Neurosurg* 53:416–424
- da Silva L, Rubens H, Lachat JJ (2003) Study of corpus callosum in experimental hydrocephalic wistar rats. *Acta Cir Bras* 18:10–14
- Hale P, McAllister J, Katz S, Wright LC, Lovely T, Miller D (1992) Improvement of cortical morphology in infantile hydrocephalic animals after ventriculoperitoneal shunt placement. *Neurosurg* 31:1085–1096
- Yingling C, Meuli-Simmen C, Meuli M, Timel G, Harrison M, Adzick S (1999) Experimental fetal neurosurgery: effects of in-utero manipulations of somatosensory evoked potentials. *Ped Surg Int* 15:535–539
- Jennigs RW, Wilkinson C, Westerberg B (2006) Chari malformation develops in surgically created myelomeningocele and its prevented by repair of the myelomeningocele in fetal lambs. *Am J Obstet Gynecol* 41:11–13
- Meuli A, Simmen C, Hutchins GM (1995) In utero surgery neurologic function at birth in sheep with spina bifida. *J Pediatr Surg* 30:342–347
- Meuli M, Meuli-Simmen C, Yingling CD, Hutchins GM, Seller M, Harrison MR, Adzick S (1995) Creation of myelomeningocele in utero. A model of functional damage from spinal cord: exposure in fetal sheep. *J Pediatr Surg* 30:1028–1032
- McLone DG (1989) The cause of Chiari II malformation: a unified theory. *Pediatr Neurosci* 15:1–12
- de Wit O, den Dunnen W, Sollie K, Iris R, Meiners L, Brouwer O, Rodriguez E, Silval D (2008) Pathogenesis of cerebral malformations in human fetuses with myelomeningocele. *Cerebrospinal Fluid Res* 5:4
- Jimenez AJ, Tome M, Wagner C, Rodriguez S, Fernández-Llebrez P, Rodriguez EM, Pérez-Figares JM (2001) A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:1105–1119
- Golden JA, Hardin BN (2004) Pathology and genetic developmental neuropathology. Neuropathy Press, Baser
- Lawson RF, Raimondi AJ (1973) Hydrocephalus-3, a murine mutant. Alterations in fine structure of choroid plexus and ependyma. *Surg Neurol* 1:115–128
- Page RB, Leure-duPree AE (1983) Ependymal alterations in hydrocephalus. *Neur Cer Fluid* 43:789–820
- Sarnat HB (1995) Ependymal reactions to injury. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:1–15
- Rodriguez EM (1976) The cerebrospinal fluid as a pathway in neuroendocrine integration. Review. *J Endocrinol* 71:407–443
- Humphreis P, Muzumdar D, Li Sly, Michaud D (2007) Focal cerebral mantle disruption in fetal hydrocephalus. *Pediatr Neurol* 36:236–243
- Paek BW, Farmer DL, Wilkinson CC, Albanese CT, Peakock W, Harrison MR (2000) Hindbrain herniation develops in surgically created myelomeningocele but is absent after repair in fetal lambs. *Am J Obstet Gynecol* 183:1119–1123
- Bouchard S, Davey MG, Rintoul NE, Walsh DS, Rorke LB, Adzick NS (2003) Correction of hindbrain herniation and anatomy of the vermis after in utero repair of myelomeningocele in sheep. *J Pediatr Surg* 38:451–458
- von Koch C, Compagnone N, Shinjiro H, Suzzane Y, Harrison M, Farmer D (2005) Myelomeningocele: characterization of a surgically induced sheep model and its central nervous system similarities and differences to the human disease. *Am J Obstet Gynecol* 193:1456–1462
- Juranek J, Fletcher J, Hasan K, Breier J, Cirino P, Pazo-Alvarez P, Diaz J, Ewing-Cobbs E, Dennis M, Papanicolaou A (2008) Neocortical organization in spina bifida. *Neuroimage* 40:1516–1522

Journal of Pediatric Surgery (2011) 46, 713–722



Journal of
Pediatric
Surgery

www.elsevier.com/locate/jpedisurg

Maldevelopment of the cerebral cortex in the surgically induced model of myelomeningocele: implications for fetal neurosurgery^{☆,☆☆}

Jose L. Encinas^{a,*}, Miguel Ángel García-Cabezas^b, James Barkovich^c, César G. Fontecha^d, Jose L. Peiró^e, Garriboli M. Carmen Soto^a, Víctor Borrell^f, Isabel Reillo^f, Manuel López-Santamaría^a, Juan A. Tovar^a, Diana L. Farmer^g

^aDepartment of Pediatric Surgery, Hospital Universitario “La Paz,” Madrid, Spain

^bDepartment of Pathology, Hospital Universitario “La Paz,” Madrid, Spain

^cSection of Neuroradiology, Department of Radiology, UCSF, San Francisco, CA

^dPediatric Orthopedic Unit, Department of Orthopedic Surgery, Hospital Universitario “Vall D’Hebron,” Barcelona, Spain

^eFetal and Neonatal Surgery Unit, Pediatric Surgery Service, Hospital Universitario “Vall D’Hebron,” Barcelona, Spain

^fInstituto de Neurociencias CSIC-UMH, Sant Joan d’Alacant, Alicante, Spain

^gPediatric Surgery Department and Fetal Treatment Laboratory, UCSF, San Francisco, CA

Received 25 July 2010; revised 10 November 2010; accepted 10 November 2010

Key words:

Myelomeningocele;
Brain;
Folding;
Sheep;
Cortex;
Fetal surgery

Abstract

Purpose: The purpose of this study is to describe the malformations of cortical development detected in a model of cerebrospinal fluid (CSF) leakage and the influence of surgical closure technique on developmental outcome.

Methods: Using a surgically induced model of myelomeningocele (MMC) in sheep, we studied the effects of different repair methods upon the development of hydrocephalus, the presence of the Arnold-Chiari II (AC-II) hindbrain malformation, and cerebral cortex developmental anomalies using gross and histologic (hematoxylin and eosin and Nissl staining) study techniques.

Results: A malformed cerebral cortex, including 2 anomalous cortical folding patterns, and lower brain weights were observed in the untreated animals. Hydrocephalus and AC-II malformations were also found in this group. These malformations were mostly prevented with prenatal 2-layer closure.

Conclusions: Cerebral cortical malformations and hydrocephalus, in addition to the AC-II hindbrain malformation, are disorders caused by fetal CSF leakage. These malformations were prevented with the

[☆] JLE is a research fellow of Fondo de Investigación Sanitaria (Programa Rio Hortega) Spanish Health Institute Carlos III (grant RD08/0072: Maternal, Child Health, and Development Network).

^{☆☆} This study was supported by Fondo de Investigación Sanitaria (07/0827) and Fundación Mutua Madrileña 2007 and 2009 to JLE. This study was also funded in part by grants from MICINN (SAF2009-07367) and from The International Human Frontier Science Program Organization (CDA0027/2007) to VB. IR is a recipient of an FPU fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN).

* Corresponding author. Department of Pediatric Surgery, La Paz University Hospital, Paseo de la Castellana 261, 28230, Madrid, Spain. Tel.: +34 917277019. UCSF, Fetal Treatment Laboratory, 531 Parnassus Ave, San Francisco, CA. Tel.: +011415-4760449.

E-mail address: encinas.j@tiscali.it (J.L. Encinas).

technique of MMC closure currently used in humans. Both observations magnify the importance of the second hit associated with chronic CSF leakage, in addition to the primary defect causing the MMC, in the development of the malformation complex.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Myelomeningocele (MMC) is a neural tube closure defect that is often associated with cognitive impairment, including well-described neuropsychological strengths in language areas and weaknesses in cognitive spatial skills that appear to be related to different patterns of cortical reorganization. Several associated malformations of cortical development have been described that are generally considered as a part of the spectrum of malformations caused by the unidentified primary insult [1-6].

New imaging tools [7] and achievement of a prenatal MMC repair technique have increased the interest in this whole field, especially because potential positive effects on neurocognitive development have been described by the Children's Hospital of Philadelphia [8-10]. A preliminary report revealed that some of the brain abnormalities associated with MMC in human patients are also found in the uncorrected fetal lamb model of MMC [11]. Because this was a surgically created spinal defect, the finding of cerebral cortical abnormalities was unexpected and of great interest because the finding of a secondary brain insult owing to cerebrospinal fluid (CSF) loss would strongly support arguments for prenatal repair of MMC.

The purpose in this article is to describe a previously unreported cortical malformation induced by surgical creation of a spinal lesion that results in loss of CSF volume in the fetal lamb at midgestation. In addition, the influence of different prenatal repair modalities on the presence and severity of the cortical malformation and developmental outcome is described, with special emphasis on the technique used in humans in the Management of Myelomeningocele Study (MOMS) trial. Morphologic results, other unreported findings such as hydrocephalus, and some probable etiologies are also discussed.

1. Materials and methods

All our work was performed with approval of the Animal Care Committee of our hospital in Madrid and according to European Council Directives (C86/609/EEC and 2003/65/EC) and Spanish guidelines (Boletín Oficial del Estado of March 18, 1988). Pregnant ewes were delivered to the laboratory 1 week before the intervention and housed in an appropriate establishment with free access to food and water except for the last 24 hours. An ultrasound study was performed before anesthetic proceedings to confirm pregnancy and to determine fetal number, position, and gestational age. Each ewe was positioned supine, intubated, anesthetized with propofol (10 mg/kg), and maintained with isoflurane 2% to 2.5% in oxygen 2 L/min.

Postoperative pain was assessed with observation of changes in posture, locomotor activity, and alimentary behavior and was treated with a transdermal fentanyl patch.

An MMC-like lesion was surgically created in 25 fetal lambs on day 75 of gestation [12-14]. A midline maternal laparotomy and, as previously described by Meuli et al [12,13], bilateral and lower lumbar laminectomy were performed in the fetus, followed by a middle myelotomy until leakage of CSF was observed. The fetuses were distributed in 3 groups. Fifteen lambs (of 25; 60%) did not undergo fetal repair (group A); and at day 100, 5 (20%) were repaired with open surgical closure (group B) and 5 (20%) with open bioglu (Cosseal; Baxter España, San Fernando, Madrid, Spain) coverage (group C). Three animals were used as normal controls (group D). Three preterm animals at day 70 of gestation were studied to assess cerebral folding process the day the defect was created.

1.1. Anatomical studies and histopathologic methods

After surgery, fetuses were allowed to go to term (day 140) and were delivered by cesarean birth. They were killed within 24 hours and perfused transcardially with 7% paraformaldehyde. The lambs were decapitated. Lamb skulls were hemisectioned on the midline looking for hindbrain herniation as defined by cerebellar tissue below the foramen magnum [15]. Brains were dissected and removed from the skull including the cerebellum, weighed, and postfixed for 24 hours in 4% paraformaldehyde. Brains were hemisectioned in the midline, and photographs were taken from the convexity and the midplane (Nikon D40× 10-mp camera, Nikon España, Madrid, Spain). The cortical surface was examined looking for migration defects and sulcation patterns and the medial view for subependymal nodules and hydrocephalus. The examiner was the same in the whole group and was blinded regarding whether the fetal sheep was normal, unrepaired, or prenatally repaired. External patterns of cortical sulcation were divided into normal, undersulcation (pachygyria-like), and excessive sulcation (polymicrogyria-like), depending on the external appearance of sulci and gyri. Pachygyria-like sulcation consists of shallow sulci and broad gyri and can be considered incomplete sulcation. Polymicrogyria-like sulcation consists of many thin, irregular gyri with variably deep sulci and can be considered as high degree of folding.

The nomenclature of sulci and gyri has been extensively described in ovine cerebral hemispheres. We choose the nomenclature of Louw [16] for our work because it is current and because it also considers the descriptions of previous authors [17,18]. The nomenclature is summarized in Table 1,

Maldevelopment of cerebral cortex in myelomeningocele

715

and the exact locations of the various sulci and gyri were determined by examining the pictures. To determine the differences between each group, the results were described by the proportion of identifiable structures in Table 1.

Each hemisphere was sectioned in the coronal plane to obtain 1-cm-thick blocks; the first coronal section passed through the anterior white commissure.

Blocks were paraffin embedded, and 6- μ m sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Nissl. Conventional histologic studies were used to determine neuronal migration disorders usually associated with abnormal sulcation and to discern possible etiologies.

Live sheep embryos were obtained from the slaughterhouse Murgaca (Cartagena, Spain) to determine normal brain development at the gestational time at which the defect was created. These animals were obtained from live sheep embryos from the slaughterhouse and added to the group. The embryonic age of the collected embryos was determined a posteriori based on the crown-rump length. Perfusion and brain section were performed following the previously described methods. In this case, Nissl staining was used.

1.2. Statistical methods

The results were expressed as percentages or as means \pm SD, and groups were compared by either 2-way analysis of variance or nonparametric tests with a threshold of significance at $P < .05$.

2. Results

Nine lambs (of 15; 60%) in group A, 3 (of 5; 60%) in group B, and 2 (of 5; 40%) in group C were delivered at term by cesarean birth. In group B, the lumbar defects were closed. In

group C, the lumbar defect was open; but some fibrous tissue was present, covering it incompletely. In group A, we found 5 animals with spontaneous closure of the defect in spite of the absence of any prenatal attempt to close or cover it; in the other 4 animals, the defect was open and had the usual cystic shape described elsewhere [12,13]. There were no differences in lumbar defect size or gestational age between the spontaneous coverage group and the open lumbar defect group.

2.1. Brain malformations (anatomical description of sulci and gyri)

The proportion of identifiable structures from Table 1 [16] is represented in Fig. 1.

2.1.1. Normal animals (group D)

The pattern of sulci and gyri described by Louw [16] is clearly visible, and the proportion of identifiable

Table 1 Number and position of fissures, gyri, and sulci

Lateral/cranial	Medial	
1. F sylvia	12. S marginalis	21. S ectogenualis
2. S presylvius	13. G marginalis	22. G genualis
3. G sylvius rostralis	14. S endomarginalis	23. G ectogenualis
4. S suprasylvius	15. G endomarginalis	24. S endogenualis
5. G suprasylvius	16. S coronalis	25. S esplenialis
6. G obliquus caudalis	17. G coronalis	26. S endoesplenialis
7. G obliquus rostralis	18. S cruciatus	27. G cinguli
8. S obliquus	19. G precruciatu	28. S corporis callosi
9. S ectosylvius	20. G postcruciatu	29. Corporis callosi
10. G ectosylvius		
11. S rhinal		

F indicates fissura; G, gyrus; S, sulcus.

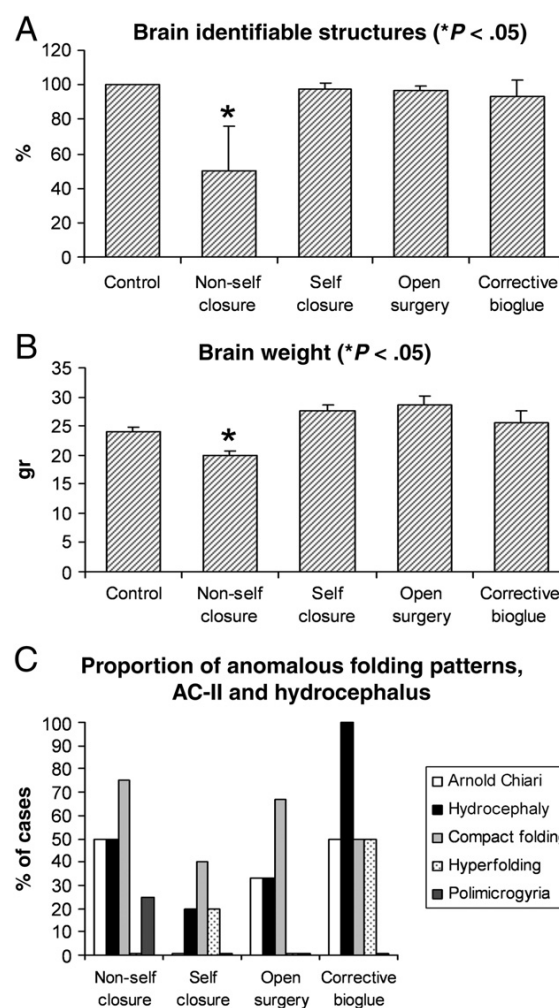


Fig. 1 A, Brain identifiable structures. B, Brain weight. C, Proportion of malformations.

structures from Table 1 was 100% in all the cases. All sulci were completely formed and of normal depth. The external appearance was virtually identical to the adult

animal [16]. No hydrocephalus or Arnold-Chiari II (AC-II) hindbrain malformation was observed (Fig. 2A, C, and E).

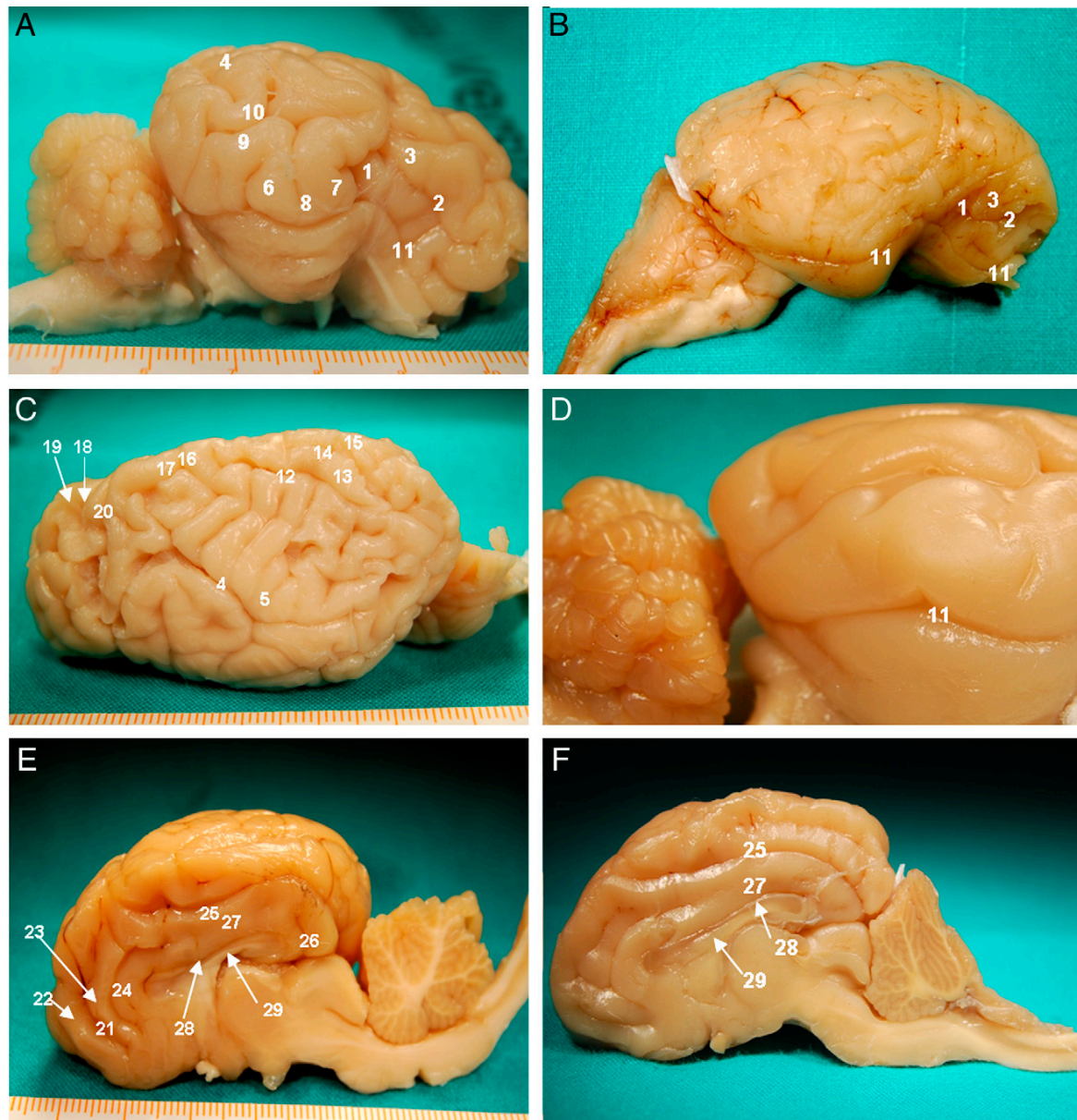


Fig. 2 Comparison between normal and untreated animals. A, C, and E, Normal sulci and gyri of ovine cerebral hemispheres. Lateral, dorsal, and medial view of right and left cerebral hemispheres from different controls. The sulci are complete, and the brain looks like that of the adult animal. The sulci are very deep, and all of them are clearly present. Cerebellum presents a normal configuration and shape, and no AC-II malformation is observed. B, D, and F, Uncorrected animals without self-closure. B, Lateral view. Great differences can be observed with panel A in the number and depth of the sulci. Only sulcus rhinalis (11), fissura sylvia (1), sulcus presylvius (2), and gyrus sylvius rostralis (3) are clearly observed. Sulci are not complete, and they present smoother contours than those observed in controls. Gyri related to sulcus obliquus (8) and sulcus ectosylvius (9) are not observed. Sulcus rhinalis (11) is visible, but it appears like a lateral indentation; it is not well observed at its rostral aspect. A severe hindbrain herniation is also observed. D, Detail of temporal-occipital lobe. Sulcus rhinalis (11) is well observed, but gyri related to sulcus obliquus (8) are absent. Configurations of gyri related to sulcus ectosylvius (9) are different from those found in controls. F, Medial view. A severe hindbrain herniation is observed. Sulci and gyri are present but with lower depth. Sulcus endoesphenialis (26) is not observed, and sulcus coronalis (16) and cruciatus (18) are not clearly visible.

Maldevelopment of cerebral cortex in myelomeningocele

717

2.1.2. Uncorrected animals without self-closure (4 animals of group A)

Continued leakage of CSF was associated with abnormal cerebral cortical anatomy. Less than 80% of normal structures were identified (in 1 case, <20%). The difference in the percentage of identifiable structures between this group and the

other coverage modalities was significant ($P < .05$) (Fig. 1). Sulci were incompletely formed, and they were shallower than those observed in controls. The abnormal patterns were mostly found in the temporal and occipital lobes, with the spectrum of malformations ranging from extensive areas of polymicrogyria to incomplete pachygyria and the presence of

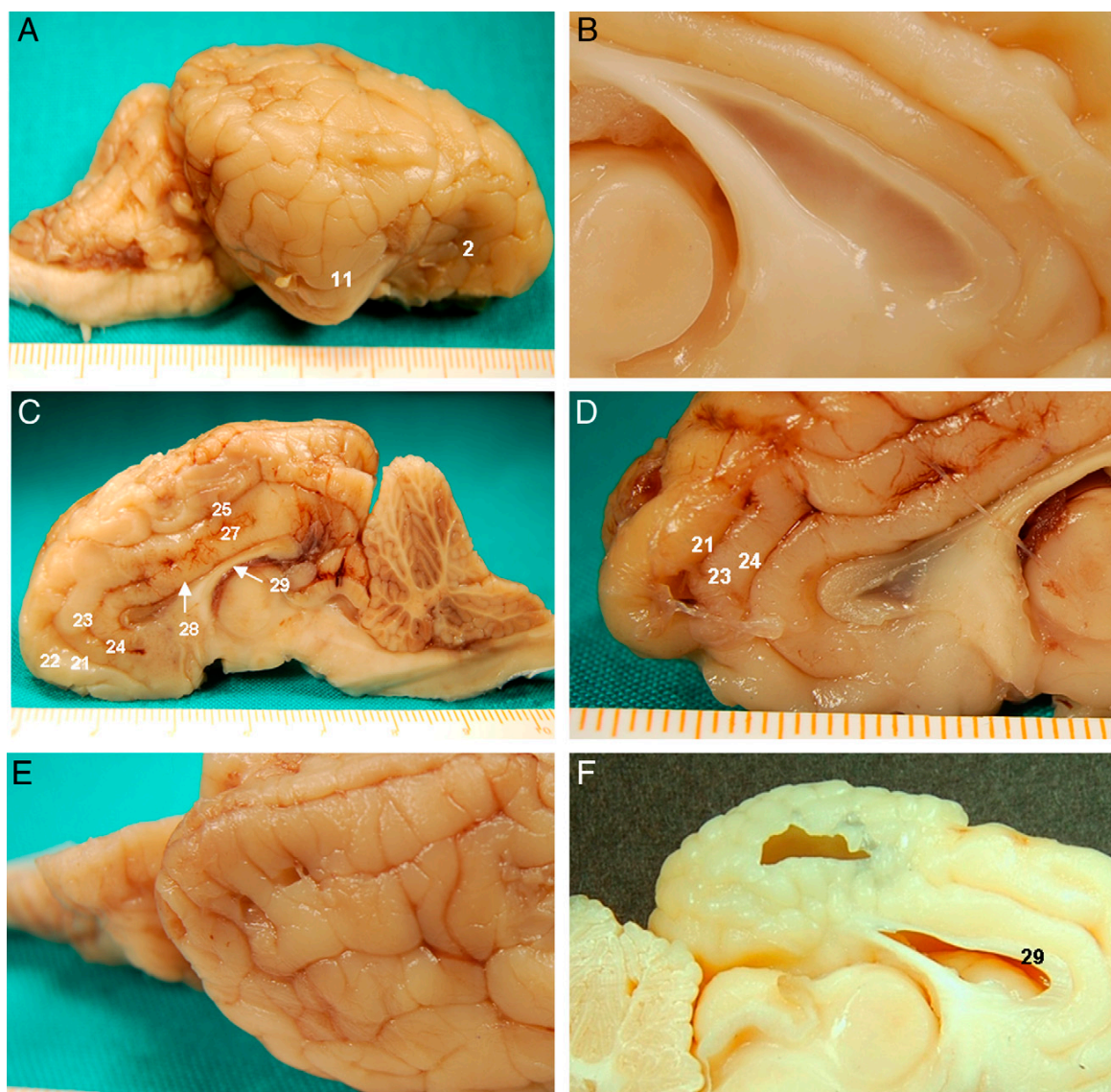


Fig. 3 Uncorrected animals without self-closure. A, Lateral view. There is an absence of normal pattern in gyri and sulci. Only sulcus presylvius (2) and sulcus rhinalis (11) could be observed, and they are shallower than those described in controls; in fact, sulcus presylvius is almost absent. Arnold-Chiari II malformation is also observed. B, Medial view. Mild degree of hydrocephalus. C, Medial view. Sulci and gyri are present but with lower depth. Sulcus endoesplenialis (26) is not observed, and sulcus coronalis (16) and cruciatus (18) are not clearly visible. D, Medial view; detail of frontal lobes. Sulcus endogenualis and gyrus ectogenualis are normal. There is an absence of continuity in sulcus ectogenualis; gyrus genualis is also incomplete. E, Detail of occipital-temporal lobe. Presence of smooth contours cortex. The pattern of normal sulci and gyri is completely absent, which could be described as pachygyria. F, Medial view shows that polymicrogyric areas in the parietal and occipital lobe also affect their medial aspects. The diencephalon, the cerebellum, and the brainstem are grossly normal; but the posterior portion of the corpus callosum is thinner than the anterior. A high-degree hydrocephalus is observed in the lateral ventricles.

rudimentary sulci (Fig. 2B, D, and F and Fig. 3). Arnold-Chiari II malformation and hydrocephalus were also observed in this group (Fig. 1).

2.1.3. Open fetal surgery, coverage with bioglue and spontaneous coverage (groups B and C and 5 animals of group A)

Any type of prenatal coverage that impeded CSF leakage was associated with identifiable sulci and gyri. Sulci were completely formed, and more than 95% of the expected structures could be identified (Fig. 1). When the spinal defect was covered with bioglue, cortical changes were slightly more severe; and a mildly lower proportion of identifiable structures was observed (Fig. 1). The absence of sulcus endoesphenialis in both of the animals treated with bioglue is particularly interesting because of its proximity to the posterior fossa, where most of the cortical lesions were concentrated. In these animals, bioglue alone seemed to be insufficient to stop CSF leakage during gestation; and they developed AC-II hindbrain malformations. These malformations were not observed in the lamb cases with spontaneous closure, supporting a hypothesis that the glue failed to completely stop the fluid leakage and also prevented complete spontaneous closure. Lambs treated with open fetal surgery and the self-closure groups had higher proportions of identifiable cerebral cortical structures and a lower incidence of AC-II hindbrain malformations and hydrocephalus than the bioglue or non-self-closure groups (Fig. 1).

2.2. Brain weights

Brain weights are represented in Fig. 1. The weight of those with an open defect without self-closure was significantly less than that in the rest of the groups.

2.2. Hydrocephalus was present in every group except in controls

Two of them (2/5; 40%) were associated with AC-II hindbrain malformations, and 1 (1/5; 20%) was associated with ependymal denudation (Fig. 1).

2.3. Cortex folding patterns and neuropathologic findings

At day 70 of gestation, the fetal lamb brains showed the first sulci and the presence of cell migration within the developing cerebral mantle (Fig. 4).

Postnatally, study of coronal sections allowed the detection of 2 anomalous sulcation patterns (Fig. 4). Pachygyria- and polymicrogyria-like areas were found in every group but the controls. The open-surgery group and the self-closure group had high proportions of normal folding patterns. *Proper polymicrogyria*, defined as thinner sulci with absence of normal cortical layers, was only found in the nontreated group without self-closure (Fig. 1).

3. Discussion

The formation of the cerebral cortex begins at about the sixth embryonic week with the formation of the ventricular zone of the dorsal (pallial) and ventral (subpallial) germinal matrices. Glutamatergic neurons are produced in the dorsal germinal matrix, from which they migrate radially to the developing cortex, using radial glial fibers as guides. In contrast, GABAergic neurons are produced in the ventral germinal matrix and have a more complex route to the cortex, involving both tangential and radial migration. Upon arriving in the cortex, migrating neurons receive signals from cells in the molecular zone, disengage from the radial glial fibers, and establish contact with other cortical and subcortical targets in a process known as *cortical organization*. The final stages of migration are dependent upon interactions with the pial limiting membrane and the overlying leptomeninges. Interference with any of these processes of neuronal proliferation, neuronal migration, and cortical organization results in a spectrum of disorders known collectively as *malformations of cortical development* [19-22]. Abnormal sulcation is seen in many of these disorders, presumably because the layering of neurons within the cortex is disturbed or because the axonal connections are aberrant; however, the precise origin of normal sulcation is poorly understood [23,24].

Fig. 4 Cortex folding patterns and neuropathologic findings. A, Macroscopic view of a prenatal sheep brain at day 70 of gestational age showing the appearance of the first sulci (white arrow). B, Coronal section of the brain in panel A showing the migration of cells from the germinal matrix to the developing cortex where the first sulci are appearing; the black arrow points to the same sulcus as the white arrow in panel A (Nissl staining). C, Macroscopic view of a control brain showing the normal pattern of cortical folding. The asterisk marks a normal gyrus. D, Coronal section of the brain in panel C showing deep sulci and normal gyri (H&E staining). E, Macroscopic view of a brain showing the pachygyria-like pattern of cortical folding. The asterisk marks an area of thicker gyri and thinner sulci; the arrow points to the AC-II malformation. F, Coronal section of the brain in E. The asterisk marks an area of shallow sulci and thicker gyri; the lateral ventricle is slightly dilated (H&E staining). G, Macroscopic view of a brain showing the polymicrogyria-like pattern of cortical folding. The asterisk marks a thinner gyrus (compare the areas marked by asterisks in panels C, E, and G). H, Coronal section of the brain in G. The asterisk marks an area of deep sulci and thinner gyri; the lateral ventricle is moderately dilated (H&E staining). The white vertical lines in panels C, E, and G mark the levels of the coronal sections of D, F, and H. LV indicates lateral ventricle; Th, thalamus.

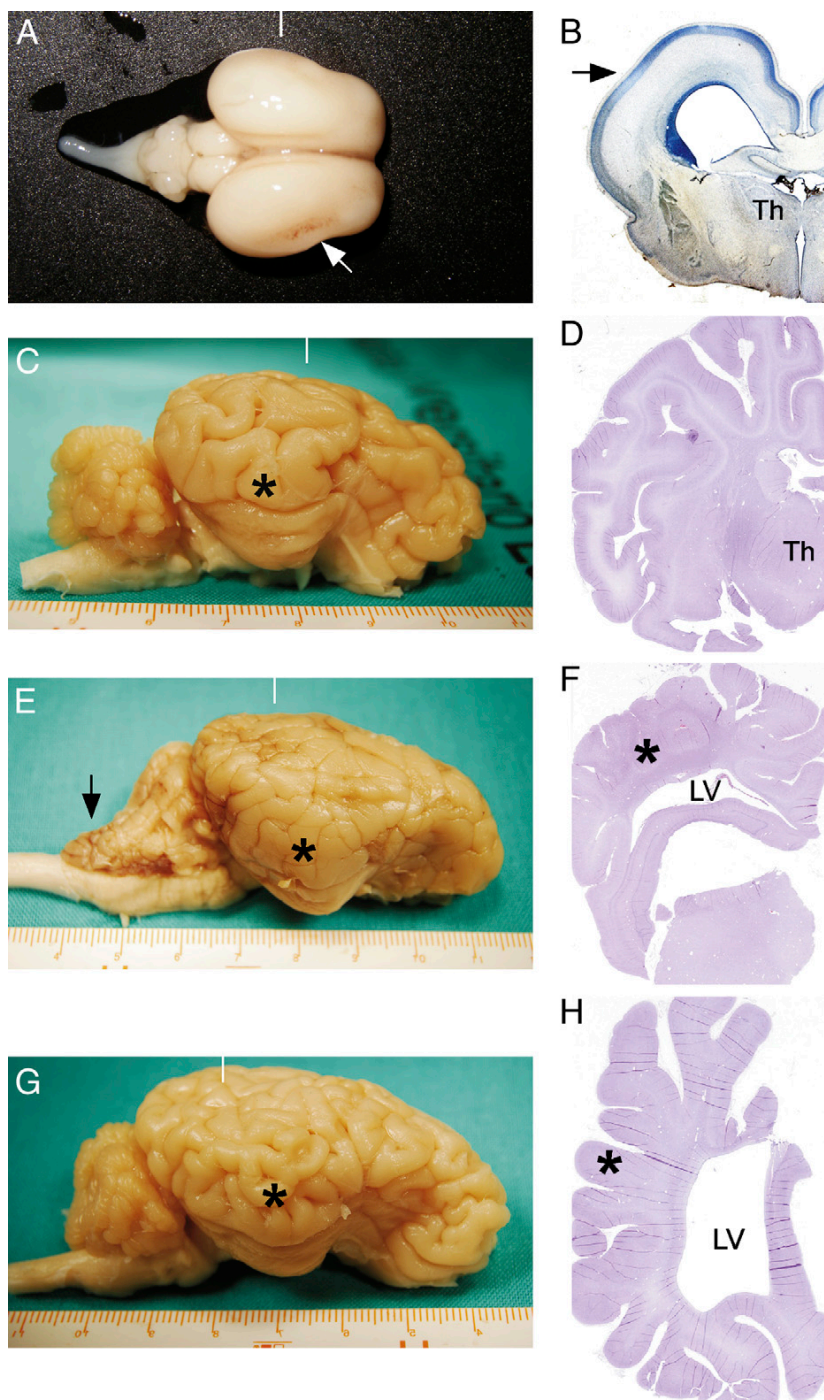
Maldevelopment of cerebral cortex in myelomeningocele

719

3.1. Cortical folding patterns in human MMC

Magnetic resonance surface analyses of the cerebral cortex in patients with MMC have shown reduced cortical thickness in occipital-temporal regions and increased cortical thickness in frontal regions based on group comparisons with

healthy age-matched controls [2]. These findings of altered spatial patterns suggest a cortical distribution that correlates well with MMC cognitive strengths and weaknesses. The same authors have recently reported how some of these thinning and thickening areas also presented areas of increased and reduced cortical complexity [3]. As in humans,



we found areas of polymicrogyria- and pachygyria-like folding dispersed through the whole cortical surface and mainly located in temporal and occipital areas. These different folding patterns could not be considered as pathologic in themselves. They have been simply related with compactness of neural connectivity and perhaps with differences in domains of cognitive function [3,4]. Although nonpathologic, these anomalous patterns were only absent in normal animals; and only open surgery seemed to prevent them, but only partially.

3.2. Characterization of the model and its brain similarities with the human disease

Abnormalities of the cerebral cortex have been described in patients with MMC. In an MMC postmortem series described by Gilbert et al [5], 92% of children were found to have some kind of cerebral cortical malformation including periventricular nodular heterotopias, polymicrogyria, and, in some cases, profound primitive developmental disruption [6]; other authors have noted similar findings [7]. The use of fetal and postnatal magnetic resonance imaging has, therefore, made a significant contribution to detection of brain malformations of cortical development in MMC.

Working with the surgically induced sheep MMC model, von Koch et al [25] described some axonal tract degeneration on the fimbria-forniceal pathway, suggesting a possible disruption of this pathway owing to alterations of CSF flow dynamics resulting from the MMC-like defect. Working with the same model, our group published a preliminary study reporting the presence of hydrocephalus and heterotopia [11].

The chronology of sulcation in normal sheep has been well documented by Louw [16]. Being a large mammal, the pattern is quite constant; and the nomenclature is well established. In the present study, we have shown that any kind of prenatal coverage of the open spinal defect, including the well-described spontaneous coverage of the model [12,13], results in normal brain weight and the normal development of sulcation as described by Louw. In contrast, those animals with an open spinal defect through the entire last half of gestation had lower brain weights and sulcation abnormalities. As in humans, the malformations vary from a mild pachygyria-like malformation to extensive areas of polymicrogyria and heterotopia with complete loss of brain architecture.

3.3. Possible mechanisms of cortical maldevelopment and hydrocephalus in MMC

Studies in animal models and humans have shown that CSF contains essential molecules for neural proliferation and migration [26]. In addition, fetal ependymal cells can release molecules via their long basal ependymal processes that extend into germinal matrix and white matter [27].

Because the ependymal role is also the maintaining of radial glial cells that guide neuroblast, a late disruption like

ours may produce neural migration disorders in previously well-developed areas [28]. Results from de Wit et al [29] could support that theory; working with human fetal MMC, they described how ependymal denudation and abnormal neural migration can occur before the onset of the rest of the brain malformations. The ependyma in one of our nontreated cases was denuded and associated with highly disrupted cortical organization. Astroglial reaction confirmed that ependyma denudation was not a consequence of poor fixation [11]. The rest of the malformed brains showed preservation of the ependymal lining. Nevertheless, neither a later reparative process nor the presence of other changes related to diffusible molecules or filament proteins could be assessed with the conventional histologic procedures used here.

Hydrocephalus has been described as being associated with AC-II [5] and ependymal denudation [30], and its marked presence in all our groups with these same related findings is a previously unreported observation in the model. Small changes in CSF hydrostatic pressure may affect ependymal development, and this has been described in mice being the lesion before hydrocephalus development [30]. At any rate, how hydrocephalus itself could produce cortical dysplasia and ependymal injury is well established [31,32]; and perhaps, our defect was created too late to produce a profound ependymal disruption. So again, it is difficult to discern the initial lesion.

Another possible mechanism is suggested by studies of *Foxc1* mutant mice that reveal cortical dysgenesis. *Foxc1* is expressed only in the developing leptomeninges and not in the developing cerebral cortex. However, the work of Hecht et al [22] suggests that defects develop in the pial limiting membrane of the developing cortex because of cortical growth and that *Foxc1* is necessary for repair of these defects [21]. In the absence of repair, the cortex is dysmorphic, with overmigration of neurons into the subarachnoid space through gaps in the pial limiting membrane. Similar defects in the pial limiting membrane might be caused by fetal hydrocephalus. Although our nontreated animals presented similar findings, it is hard to suggest any consequence other than that leakage of CSF probably disrupts the delicate equilibrium of signaling factors and hydrostatic pressures. This could impair ependymal or meningeal development even in later stages with the consequences in cortical and ventricular morphogenesis described in humans and now in the surgically induced sheep model.

3.4. Neurocognitive improvements achieved by prenatal coverage of MMC in humans (prenatal closure of the defect)

In neurobehavioral outcomes, few children with MMC have severe mental retardation. Their weaknesses involve reading, spatial construction skills, attention, orientation, and behavioral regulation. Cognitive skills involving language and word recognition mediated by frontal networks are

Maldevelopment of cerebral cortex in myelomeningocele

721

preserved [1]. Prenatal elective layered closure of MMC reverses hindbrain herniation, reduces the incidence of ventriculoperitoneal shunt, and improves cognitive results in some children [8-10,33,34].

The etiologies of these cognitive improvements are controversial and will need further research by the MOMS study. Anyhow, they are usually related to the complications of shunting [8,35] or hydrocephalus [36,37]. Our results describe how CSF loss itself induces developmental outcomes similar to those found in humans, thus highlighting the importance of prenatal repair. In our work, the most effective way to achieve this purpose seemed to be open fetal surgery, which allowed development of normal patterns and structures and decreased hydrocephalus and AC-II malformation in higher proportions than the rest of the treatments. The use of bioglue could have an application in fetoscopic surgery, but it produced just a part of the benefits obtained by open surgery. In humans, fetoscopic approaches have been described as extremely challenging and are still only isolated reports [38-41].

In summary, in our model, gyral malformations and hydrocephalus may be added to the sequence produced by CSF loss; and both can be mostly prevented prenatally with the technique used nowadays in the human trial. This observation magnifies the importance of the second hit at the expense of the unknown primary insult.

Acknowledgments

We thank Dr Francisco Hernández, Dr Manuel Gámez, Dr Fernando Carceller, Delia Aguado, Carol Fox Warren, Robert Kellar, Luis Javier Ruiz-Morote, Mariana de Abreu, and Dr Carlota Largo for their indispensable collaboration. We also thank the personnel from the Experimental Department—Isabel, Maria Antonia, Maribel, Pablo, Pedro, and Belen—for their endurance and superb veterinary care. From University of California, San Francisco, we are specially grateful to Dr Pleasure for his kind availability and his wise suggestions and to Dr Doug Miniati, Dr Eric Jelin, and Elizabeth Gress for their friendly behavior and constant help.

References

- [1] Fletcher JM, Copeland K, Frederick JA, et al. Spinal lesion level in spina bifida: a source of neural and cognitive heterogeneity. *J Neurosurg* 2005;102:268-79.
- [2] Juranek J, Fletcher JM, Hasan KM, et al. Neocortical reorganization in spina bifida. *Neuroimage* 2008;40:1516-22.
- [3] Juranek J, Salman MS. Anomalous development of brain structure and function in spina bifida myelomeningocele. *Dev Disabil Res Rev* 2010;16:23-30.
- [4] Dennis M, Edelstein K, Hetherington R, et al. Neurobiology of perceptual and motor timing in children with spina bifida in relation to cerebellar volume. *Brain* 2004;127:1292-301.
- [5] Gilbert JN, Jones KL, Rorke LB, et al. Central nervous system anomalies associated with meningomyelocele, hydrocephalus, and the Arnold-Chiari malformation: reappraisal of theories regarding the pathogenesis of posterior neural tube closure defects. *Neurosurgery* 1986;18:559-64.
- [6] Pinar H, Tatevosyants N, Singer DB. Central nervous system malformations in a perinatal/neonatal autopsy series. *Pediatr Dev Pathol* 1998;1:42-8.
- [7] Glenn OA, Barkovich J. Magnetic resonance imaging of the fetal brain and spine: an increasingly important tool in prenatal diagnosis: part 2. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;27:1807-14.
- [8] Johnson MP, Gerdes M, Rintoul N, et al. Maternal-fetal surgery for myelomeningocele: neurodevelopmental outcomes at 2 years of age. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:1145-50 [discussion 1150-1142].
- [9] Adzick NS. Fetal myelomeningocele: natural history, pathophysiology, and in-utero intervention. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010;15:9-14.
- [10] Danzer E, Gerdes M, Bebbington MW, et al. Preschool neurodevelopmental outcome of children following fetal myelomeningocele closure. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202(5):450.e1-9.
- [11] Encinas Hernandez JL, Soto C, Garcia-Cabezas MA, et al. Brain malformations in the sheep model of myelomeningocele are similar to those found in human disease: preliminary report. *Pediatr Surg Int* 2008;24:1335-40.
- [12] Meuli M, Meuli-Simmen C, Yingling CD, et al. Creation of myelomeningocele in utero: a model of functional damage from spinal cord exposure in fetal sheep. *J Pediatr Surg* 1995;30:1028-32 [discussion 1032-1023].
- [13] Meuli M, Meuli-Simmen C, Hutchins GM, et al. In utero surgery rescues neurological function at birth in sheep with spina bifida. *Nat Med* 1995;1:342-7.
- [14] Bouchard S, Davey MG, Rintoul NE, et al. Correction of hindbrain herniation and anatomy of the vermis after in utero repair of myelomeningocele in sheep. *J Pediatr Surg* 2003;38:451-8 [discussion 451-458].
- [15] Paek BW, Farmer DL, Wilkinson CC, et al. Hindbrain herniation develops in surgically created myelomeningocele but is absent after repair in fetal lambs. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1119-23.
- [16] Louw GJ. The development of the sulci and gyri of the bovine cerebral hemispheres. *Anat Histol Embryol* 1989;18:246-64.
- [17] Evans HE, Sack WO. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. *Zentralbl Veterinarmed C* 1973;2:11-45.
- [18] Smart IH, McSherry GM. Gyrus formation in the cerebral cortex of the ferret. II. Description of the internal histological changes. *J Anat* 1986;147:27-43.
- [19] Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, et al. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology* 2005;65:1873-87.
- [20] Siegenthaler JA, Ashique AM, Zarbalis K, et al. Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell* 2009;139:597-609.
- [21] Zarbalis K, Siegenthaler JA, Choe Y, et al. Cortical dysplasia and skull defects in mice with a *Foxc1* allele reveal the role of meningeal differentiation in regulating cortical development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:14002-7.
- [22] Hecht JH, Siegenthaler JA, Patterson KP, et al. Primary cellular meningeal defects cause neocortical dysplasia and dyslamination. *Ann Neurol* 2010;68:454-64.
- [23] Caviness Jr VS. Mechanical model of brain convolutional development. *Science* 1975;189:18-21.
- [24] Van Essen DC. A tension-based theory of morphogenesis and compact wiring in the central nervous system. *Nature* 1997;385:313-8.
- [25] von Koch CS, Compagnone N, Hirose S, et al. Myelomeningocele: characterization of a surgically induced sheep model and its central nervous system similarities and differences to the human disease. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:1456-62.

- [26] Rodriguez EM. The cerebrospinal fluid as a pathway in neuroendocrine integration. *J Endocrinol* 1976;71:407-43.
- [27] Sarnat HB, Darwish HZ, Barth PG, et al. Ependymal abnormalities in lissencephaly/pachygyria. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993;52:525-41.
- [28] Sarnat HB. Role of human fetal ependyma. *Pediatr Neurol* 1992;8: 163-78.
- [29] de Wit OA, den Dunnen WF, Sollié KM, et al. Pathogenesis of cerebral malformations in human fetuses with meningomyelocele. *Cerebrospinal Fluid Res* 2008;5:4.
- [30] Jimenez AJ, Tome M, Paez P, et al. A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:1105-19.
- [31] Lawson RF, Raimondi AJ. Hydrocephalus-3, a murine mutant: I. Alterations in fine structure of choroid plexus and ependyma. *Surg Neurol* 1973;1:115-28.
- [32] Humphreys P, Muzumdar DP, Sly LE, et al. Focal cerebral mantle disruption in fetal hydrocephalus. *Pediatr Neurol* 2007;36:236-43.
- [33] Tulipan N, Hernanz-Schulman M, Bruner JP. Reduced hindbrain herniation after intrauterine myelomeningocele repair: a report of four cases. *Pediatr Neurosurg* 1998;29:274-8.
- [34] Bruner JP, Tulipan N, Paschall RL, et al. Fetal surgery for myelomeningocele and the incidence of shunt-dependent hydrocephalus. *JAMA* 1999;282:1819-25.
- [35] Hale PM, McAllister 2nd JP, Katz SD, et al. Improvement of cortical morphology in infantile hydrocephalic animals after ventriculoperitoneal shunt placement. *Neurosurgery* 1992;31: 1085-96 [discussion 1096].
- [36] Shim I, Ha Y, Chung JY, et al. Association of learning and memory impairments with changes in the septohippocampal cholinergic system in rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Neurosurgery* 2003;53: 416-25 [discussion 425].
- [37] da Silva L, Rubens H, Lachat JJ. Study of corpus callosum in experimental hydrocephalic wistar rats. *Acta Cir Bras* 2003;18:10-4.
- [38] Bruner JP, Richards WO, Tulipan NB, et al. Endoscopic coverage of fetal myelomeningocele in utero. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180: 153-8.
- [39] Kohl T, Hartlage MG, Kiehitz D, et al. Percutaneous fetoscopic patch coverage of experimental lumbosacral full-thickness skin lesions in sheep. *Surg Endosc* 2003;17:1218-23.
- [40] Bruner JP, Tulipan NB, Richards WO, et al. In utero repair of myelomeningocele: a comparison of endoscopy and hysterotomy. *Fetal Diagn Ther* 2000;15:83-8.
- [41] Kohl T, Tchatcheva K, Weinbach J, et al. Partial amniotic carbon dioxide insufflation (PACI) during minimally invasive fetoscopic surgery: early clinical experience in humans. *Surg Endosc* 2010;24: 432-44.

Journal of Pediatric Surgery (2011) 46, 2279–2283



ELSEVIER

Journal of
Pediatric
Surgery

www.elsevier.com/locate/jpedisurg

Prenatal repair of myelomeningocele with aligned nanofibrous scaffolds—a pilot study in sheep

Payam Saadai^a, Yvette S. Nout^b, Jose Encinas^c, Aijun Wang^d, Timothy L. Downing^d, Michael S. Beattie^e, Jacqueline C. Bresnahan^e, Song Li^d, Diana L. Farmer^{a,*}

^aDivision of Pediatric Surgery and Fetal Treatment Center, Department of Surgery, University of California, HSW-1601, Box 0570, San Francisco, CA 94143-0570

^bDepartment of Animal and Veterinary Sciences, California State Polytechnic University, Pomona, CA

^cDepartment of Pediatric Surgery, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

^dDepartment of Bioengineering, University of California, Berkeley, CA

^eBrain and Spinal Injury Center, Department of Neurological Surgery, University of California, San Francisco, CA

Received 23 August 2011; accepted 3 September 2011

Key words:

Myelomeningocele;
Spina bifida;
Fetal surgery;
Biomaterials;
Nanotechnology;
Scaffold

Abstract

Background/Purpose: Spinal cord damage in myelomeningocele (MMC) results from abnormal cord development and subsequent local trauma. Prenatal surgery prevents additional neural injury. However, existing damage is not reversed. Biodegradable nanofibrous scaffolds (NSs) promote regeneration of neural tissues. They mimic the microtopography of the extracellular matrix and guide tissue formation and organization. The purpose of this pilot study was to evaluate the practicality and safety of using biodegradable NS as a regenerative device in prenatal MMC repair.

Methods: Two fetal lambs underwent a surgically induced MMC defect followed by open fetal repair using aligned biodegradable NS. Lambs were killed at day 138. Spinal cords were examined for inflammation or fibrosis and stained for spinal cord architecture, myelin, and neuron cell bodies.

Results: Prenatal repair with NS demonstrated technical feasibility. There was no evidence of a surrounding inflammatory response or foreign-body reaction to the scaffold.

Conclusion: Biodegradable NS can be used surgically for the prenatal repair of MMC in a large animal model and does not appear to elicit an inflammatory or fibrotic reaction in fetal tissue. Further studies will determine their potential for neural cell infiltration, delivery of growth factors, drugs or stem cells, and functional recovery greater than standard repair.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Presented at the Pacific Association of Pediatric Surgeons 44th Annual Meeting, Cancun, Mexico, April 10–14, 2011.

* Corresponding author. UCSF Benioff Children's Hospital, HSW-1601, Box 0570, San Francisco, CA 94143-0570. Tel.: +1 415 502 7387; fax: +1 415 476 2314.

E-mail addresses: payam.saadai@ucsfmedctr.org (P. Saadai), diana.farmer@ucsfmedctr.org (D.L. Farmer).

0022-3468/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jpedsurg.2011.09.014

Open spina bifida, or myelomeningocele (MMC), is a neural tube closure defect that is associated with impaired distal neurologic function and cognitive disabilities. Spinal cord damage associated with MMC is owing to, first, abnormal spinal cord development and, second, subsequent traumatic and chemical injury to the exposed cord [1,2]. To prevent the secondary in utero damage associated with an open spinal cord,

prenatal MMC surgery consists of in utero closure of the dura mater and overlying soft tissues. Results of the recently completed National Institutes of Health-sponsored Management of Myelomeningocele Study randomized, controlled clinical trial comparing prenatal vs postnatal repair demonstrated that prenatal repair is comparably safe and efficacious in improving MMC-associated hindbrain herniation [3]. Despite partially improved motor outcomes, however, distal neurologic function remains incomplete even after prenatal MMC repair. Presumably, simple closure fails to reverse the neurologic injury already incurred before surgery.

To target prior in utero damage to the spinal cord, we hypothesized that the addition of biodegradable nanofibrous scaffolds (NSs) to prenatal repair would promote tissue remodeling and neuronal pathfinding and thus preserves and restores distal neurologic function better than simple closure. Nanofibrous scaffolds can serve as temporary 3-dimensional substrates to guide neotissue formation across damaged tissue and promotes new tissue formation by providing a surface with adequate porosity to foster cellular infiltration [4,5]. They can supply the appropriate biologic cues to facilitate migration, attachment, proliferation, and differentiation into specific cell phenotypes. Furthermore, through the process of electrospinning, they can be aligned to provide directionality to cellular growth [4-6]. The aim of this pilot study was to evaluate the practicality and safety of using aligned biodegradable NS as a regenerative device in the sheep model of prenatal MMC.

1. Materials and methods

This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (protocol no. 13095), and all animals received care in strict compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals in a facility accredited by the Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International [7]. Two time-mated ewes were delivered 1 week before first intervention and housed in an appropriate establishment with free access to food and water except for the last 24 hours.

1.1. Creation of MMC lesion

At approximately 75 days gestation, each ewe underwent survival laparotomy for the surgical creation of a fetal MMC. Ewes were sedated (ketamine 10 mg/kg), intubated, positioned supine, and maintained with inhalation anesthesia (isoflurane 2% in oxygen 2 L/min). An MMC-like lesion was surgically created in 2 fetal lambs, as previously described [8-10]. One ewe had a twin pregnancy, and the third lamb was used as a normal control.

Briefly, midline maternal laparotomy and hysterotomy was performed, and the fetal back was exposed. After removing overlying skin and soft tissues, a bilateral lower lumbar laminectomy was performed. The spinal cord was exposed, and a midline myelotomy was opened until leakage

of cerebral spinal fluid was observed. Intravenous penicillin (1 mIU) and gentamicin (100 mg) were administered to the ewe as preoperative surgical prophylaxis. Intrauterine penicillin (1 mIU) was also administered before hysterotomy closure. Ewes were administered buprenorphine (0.005-0.01 mg/kg intramuscular) for postoperative pain control.

1.2. Repair of MMC lesion with NSs

At approximately 100 days gestation, ewes underwent a second survival laparotomy and hysterotomy. Lambs in whom the MMC lesion had been created underwent repair of

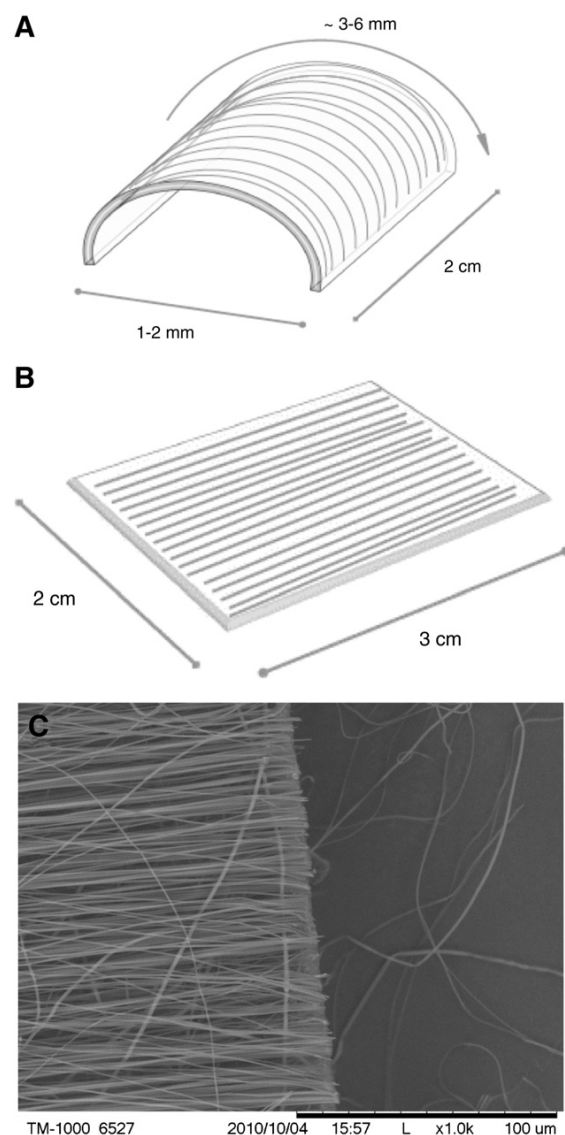


Fig. 1 Schematic representation of nanofibrous inner (A) and outer scaffolds (B). C, High-power electron micrograph of the outer scaffold showing aligned biodegradable poly L-lactic acid (1.09 dL/g inherent viscosity) nanofibers fabricated by electrospinning.

Prenatal repair of MMC with aligned NS

2281

the MMC using both an inner and outer biodegradable scaffold made of aligned electrospun poly L-lactic acid nanofibers (Lactel Absorbed Polymers, Pelham, AL) (Fig. 1). One internal semicircular scaffold aligned circumferentially was placed underneath the dural closure. A second outer rectangular scaffold aligned transversely was placed above the dural closure. Scaffolds were intraoperatively tailored to size as needed. Skin and soft tissues of the back were then closed in a final layer.

1.3. Delivery and kill

Lambs were delivered via terminal cesarean section approximately 10 days before term to prevent natural parturition. Lambs were killed and perfused with 1 L of NaCl 0.9%, with an initial bolus of lidocaine (40 mg) and heparin (1000 IU), followed by 2 L of 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer. Brain and spinal cord were then grossly examined for hindbrain herniation and appearance of the MMC lesion including appearance of the scaffolds. They were then harvested for pathologic analysis, postfixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours, and cryopreserved in sucrose. Twenty-micrometer frozen tissue sections were obtained. Tissues were stained with eriochrome cyanate and neutral red for myelin and neural cell bodies, respectively, and hematoxylin and eosin.

2. Results

Lambs were carried through to delivery without adverse event or early abortion. At the time of surgical repair, scaffolds were tailored to size and placed both in their intra- and extradural positions without difficulty (Fig. 2). Operative time was approximately 2 hours per repair.

In the control lamb, no gross abnormalities were seen, and histology was normal. The 2 lambs that underwent MMC creation and repair had similar abnormalities both on gross necropsy and histopathology, as described below.

2.1. Gross necropsy

Each repaired lamb had a small well-healed linear skin defect and a flattened lumbar area and pelvic girdle that appeared small for the lamb's size. In 1 lamb, the umbilicus was twisted around the left hindlimb just proximal to the tarsus, causing malformation of lower left hindlimb. Neuropathology revealed hindbrain and cerebellar herniation through foramen magnum, consistent with a Chiari malformation in both lambs. The lateral ventricles were noticeably larger than seen in the normal lamb, and gyri on the lateral frontal lobes were abnormally soft and collapsible. The skin over the lumbar area was adherent to the subcutaneous tissues consistent with scar formation. The lumbar vertebral spinous processes and laminae were absent. Flattened spinal cord tissue was present

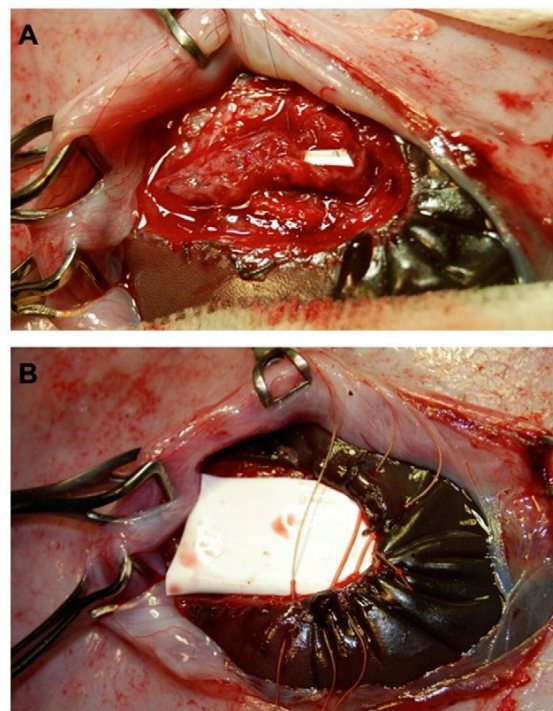


Fig. 2 Operative repair of fetal lamb with inner (A) and outer (B) NSs.

from L4 to L7. The outer scaffold was grossly visible, nonencapsulated, and partially integrated but not yet completely incorporated with the underlying cord tissue.

2.2. Histopathology

Lambs that underwent surgical MMC creation and repair showed significant loss of dorsal white matter with sparing of the ventral horns on myelin staining (Fig. 3A and B). Staining for neuronal cell bodies showed selective persistence of motor neurons in the ventral horns. The inner scaffold was visible dorsal to the central canal. Hematoxylin and eosin staining showed no evidence of lymphocytic infiltrate or abnormal connective tissue formation surrounding the scaffold (Fig. 3C and D). Astrocyte-like cells were found lining the scaffold adjacent to the cord tissue. There was no evidence of encapsulation.

3. Discussion

In this pilot study, we introduce the concept of using aligned NS in prenatal MMC repair and show that NS is feasible for use in a large animal model of fetal MMC. The scaffolds are easy to position, and operative time is comparable with standard repair. Furthermore, they appear well integrated to the surrounding tissues and were not

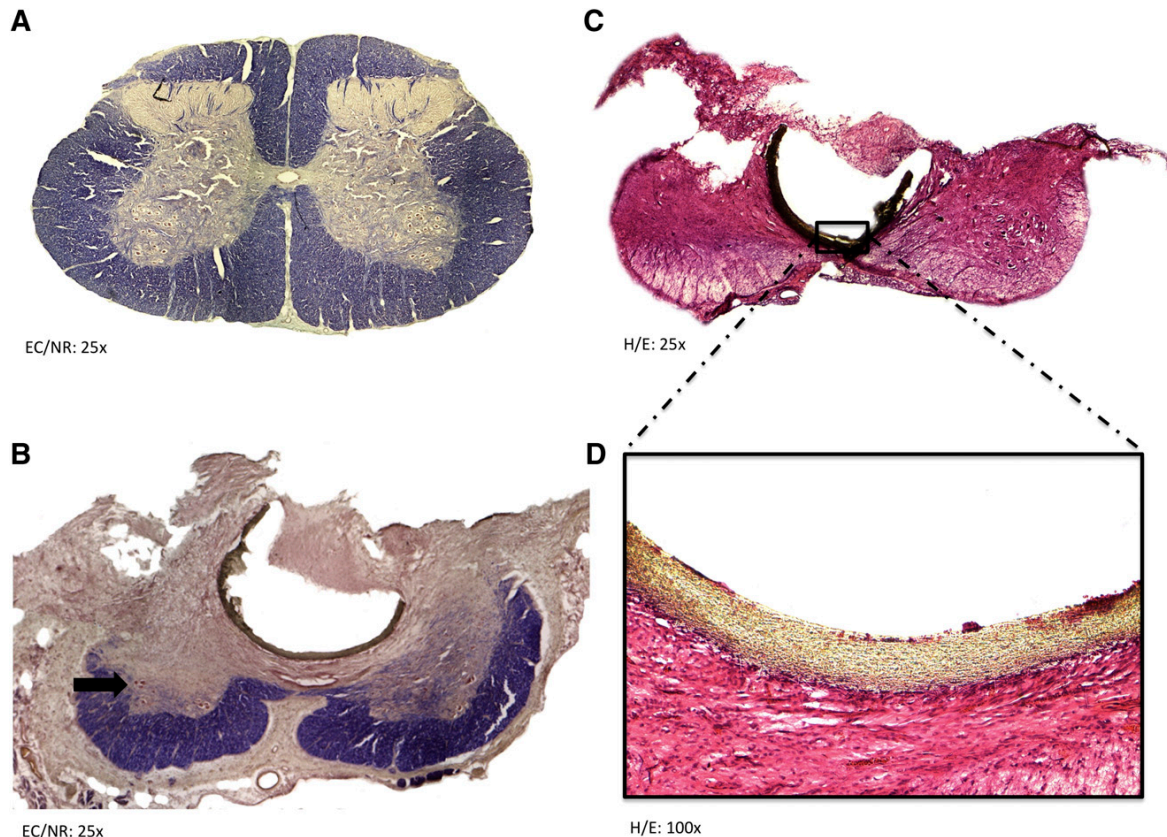


Fig. 3 Cross-sectional images of the spinal cord at lumbar vertebral levels of a normal lamb (A) and a lamb repaired with scaffold (B-D). In (B), note the loss of dorsal white and gray matter with relative sparing of ventral horns and visible motor neurons in the spared ventral gray matter (arrow). In (D), the scaffold appears well integrated with host tissues, and there is no lymphocytic or fibrotic reaction at the scaffold-spinal cord interface.

encapsulated on necropsy. Histopathology reveals no evidence of significant leukocyte infiltration or excessive connective tissue formation as would be expected by an inflammatory or fibrotic response. These results support the further investigation of NS in prenatal MMC repair as a potential enhancement to the standard established by the Management of Myelomeningocele Study trial.

Because of improvements in the management of early infectious and cerebral complications of MMC, more patients with MMC are now surviving well into adulthood. Therefore, patients will often have lifelong paralysis requiring orthoses, bladder incontinence requiring multiple operative interventions, and significant gastrointestinal dysfunction [11]. Sexual dysfunction and psychologic disturbances related to managing the peripheral manifestations of MMC are also becoming better recognized [12,13]. Because the clinical sequelae of spinal cord damage are not completely ameliorated even with prenatal surgery, improvements are needed to address the significant morbidities related to distal neurologic dysfunction.

In regenerative medicine, NSs have demonstrated the potential to bridge areas of injury. They can promote

neuronal regeneration in both spinal cord and peripheral nerve injury models and can serve as a temporary extracellular matrix for regenerative cells by emulating the microfibrillar features of collagen and other connective tissue components such as fibronectin and proteoglycans [5,14-16]. By combining prenatal MMC repair with the regenerative properties of NS, neuronal pathfinding could be promoted, and distal neurologic function theoretically improved. Simple modifications also allow NS to serve as a biodegradable local delivery mechanism for immunomodulatory substances, growth factors, and stem cells [17-19].

Regenerative therapies are particularly promising for use in prenatal repair because of the inherent plasticity and immunotolerance unique to the developing fetal environment. The fetus has long been recognized to have a remarkable ability to heal after injury [20], and work with in utero hematopoietic stem cell transplantation has shown that the fetal environment offers considerable advantages for the success of stem cell transplantation [21]. The immunologic immaturity of the early gestational fetus provides a unique opportunity for induction of donor-specific tolerance to allogeneic cells [22]. It has thus been

Prenatal repair of MMC with aligned NS

2283

suggested that fetal tolerance can potentially eliminate the requirement for immunosuppression after stem cell therapy. This research supports the addition of a regenerative treatment strategy, with or without stem cell therapy, in future modifications of prenatal MMC repair.

In this report, we use a sheep model of MMC to demonstrate that biodegradable NS is surgically feasible for fetal repair of open spina bifida. We show that NS are noninflammatory in an in vivo spinal injury model of MMC. Additional modifications to the nanofibrous polymer will determine the optimal structure and alignment of these scaffolds. Further histopathologic and functional studies will determine the potential of NS to regenerate neural tissue; to deliver growth factors, immunomodulators, and stem cells; or to attain functional recovery greater than standard prenatal repair.

References

- [1] Fichter MA, Dornseifer U, Henke J, et al. Fetal spinal bifida repair—current trends and prospects of intrauterine neurosurgery. *Fetal Diagn Ther* 2008;23(4):271-86.
- [2] Stiefel D, Meuli M. Scanning electron microscopy of fetal murine myelomeningocele reveals growth and development of the spinal cord in early gestation and neural tissue destruction around birth. *J Pediatr Surg* 2007;42(9):1561-5.
- [3] Adzick NS, Thom EA, Spong CY, et al. A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele. *NEJM*. Published Online First February 2011;9, doi:10.1056/NEJMoa1014379.
- [4] Kurpinski KT, Stephenson JT, Janairo RR, et al. The effect of fiber alignment and heparin coating on cell infiltration into nanofibrous PLLA scaffolds. *Biomaterials* 2010;31(13):3536-42.
- [5] Patel S, Kurpinski KT, Quigley R, et al. Bioactive nanofibers: synergistic effects of nanotopography and chemical signaling on cell guidance. *Nano Lett* 2007;7(7):2122-8.
- [6] Lam HJ, Patel S, Wang A, et al. In vitro regulation of neural differentiation and axon growth by growth factors and bioactive nanofibers. *Tissue Eng Part A* 2010;16(8):2641-8.
- [7] Institute for Laboratory Animal Resources. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC: National Academy Press; 1996.
- [8] Meuli M, Meuli-Simmen C, Hutchins GM, et al. The spinal cord lesion in human fetuses with myelomeningocele: implications for fetal surgery. *J Pediatr Surg* 1997;32(3):448-52.
- [9] von Koch C, Compagnone N, Hirose S, et al. Characterization of a surgically induced sheep model and its central nervous system similarities and differences to the human disease. *Am J Obstet Gynecol* 2005;93(4):1456-62.
- [10] Encinas JL, Garcia-Cabezas MA, Barkovich J, et al. Maldevelopment of the cerebral cortex in the surgically induced model of myelomeningocele: implications for fetal neurosurgery. *J Pediatr Surg* (in press).
- [11] Hunt GM, Oakeshott P. Lifestyle in adults aged 35 years who were born with open spina bifida: prospective cohort study. *Cerebrospinal Fluid Res* 2004;1(1):4.
- [12] Woodhouse C. Myelomeningocele: neglected aspects. *Pediatr Nephrol* 2005;93:1223-31.
- [13] Bellin MG, Zabel TA, Dicianno BE, et al. Correlates of depressive and anxiety symptoms in young adults with spina bifida. *J Pediatr Psychol* 2010;35(7):778-89.
- [14] Zhu YQ, Wang AJ, Shen WQ, et al. Nanofibrous patches for spinal cord regeneration. *Adv Funct Mater* 2010;20(9):1433-40.
- [15] Chew SY, Mi R, Hoke A, et al. Aligned protein-polymer composite fibers enhance nerve regeneration: a potential tissue-engineering platform. *Adv Funct Mater* 2007;17(8):1288-96.
- [16] Kim YT, Haftel VK, Kumar S, et al. The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps. *Biomaterials* 2008;29(21):3117-27.
- [17] Cao H, Liu T, Chew SY. The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(12):1055-64.
- [18] Watanabe M, Jo J, Radu A, et al. A tissue engineering approach for prenatal closure of myelomeningocele with gelatin sponges incorporating basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng Part A* 2010;16(5):1645-55.
- [19] Fauza DO, Jennings RW, Teng YD, et al. Neural stem cell delivery to the spinal cord in an ovine model of fetal surgery for spina bifida. *Surgery* 2008;144(3):367-73.
- [20] Bullard KM, Longaker MT, Lorenz HP. Fetal wound healing: current biology. *World J Surg* 2003;27(1):54-61.
- [21] Nijagal A, Wegorzewska M, Jarvis E, et al. Maternal T cells limit engraftment after in utero hematopoietic cell transplantation in mice. *J Clin Invest* 2011;121(2):582-92.
- [22] Merianos D, Heaton T, Flake AW. In utero hematopoietic stem cell transplantation: progress toward clinical application. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(7):729-40.

EN REVISION POR JPS**Prenatal treatment with mesenchymal stem cells in a teratogenic model of myelomeningocele in rats**

Jose L Encinas, †Marisa de Frias, †† Irene Lara, *Marc Oria, *Jose L Peiró, Leopoldo Martinez, Manuel López-Santamaría and §Fernando de Miguel

Department of Pediatric Surgery. Hospital Universitario «La Paz». Madrid

†Cell Therapy Laboratory. Instituto de Investigación Hospital «La Paz». Madrid

††Pathology Department. Hospital Universitario «La Paz». Madrid

*The Center for Fetal, Cellular and Molecular Therapy. Cincinnati Children's Hospital Medical Center (CCHMC). Cincinnati. Ohio. USA

§Current address: Cell Biotechnology Unit, Instituto de Investigación en Enfermedades Raras-ISCIH, Majadahonda. Madrid

This study was supported by ISCIII (Fondo de Investigación Sanitaria, PI12/01040) and FONDOS FEDER.

Corresponding author:

Jose Luis Encinas

Department of Pediatric Surgery

Unit of Fetal Medicine

La Paz University Hospital. Paseo de la Castellana 261. 28046.

Madrid. Spain

tlf: +34917277019

e-mail: joseluis.encinas@salud.madrid.org

ABSTRACT

Aim: To explore spinal cord improvement using transplanted mesenchymal stem cells in the retinoic acid (RA)-induced myelomeningocele (MMC) model in fetal rats.

Methods: Time-dated pregnant rats were fed 100 mg/kg RA dissolved in olive oil on embryonic day 10 (E10). On E18, hysterotomies were performed and polycaprolactone disc scaffolds with or without mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue (ASC) were placed over the MMC lesion. Alternatively, cell delivery was by direct injection in the amniotic cavity. Fetuses were collected at E15, E17, E19 and E21, and processed for histological assessment of the spinal cord. Structural changes, damage score and total cell number were assessed with HE and Nissl staining. Glial reactivity was studied by immunostaining for GFAP (astroglia) and for iba-1 (microglia). Cytotoxic effects of amniotic fluid on ASC were also studied. Neurotrophic and neuroprotective factors produced by ASC were assessed. **Results:** Fluorescence examination revealed ASC ingrowth into the scaffolds after 72 hours in culture. ASC in vitro produced different neurotrophic factors related to neural protection. Amniotic fluid had no cytotoxic effect on ASC, rather, it induced proliferation in vitro. No improvement in spinal damage score was produced with any prenatal procedure. Beneficial changes in microglial expression were observed after cell delivery. **Conclusions:** Prenatal mesenchymal stem cell administration modifies microglial expression in MMC lumbar areas in this model. No significant benefits were observed in the damage score, probably due to the short treatment period. Amniotic fluid did not produce negative effects on ASC in vitro, and might, in fact, induce some beneficial effects.

Key words: fetal, myelomeningocele, stem cells, scaffold

INTRODUCTION

Myelomeningocele (MMC) is a neural tube closure defect that is often associated with spinal cord damage and frequently produces paraplegia, sensory loss and urological dysfunction [1]. In the experience of the American MOMS trial, prenatal layered repair of MMC reversed hindbrain herniation, decreased the need for shunting and

improved later cognitive results; despite this huge step forward, improved leg function was less notable [2]. Tissue fragility limits the development of safe open fetal surgery before the 20th week of gestation, probably too late to allow complete spinal recovery. After cord injury and given the well-described second hit, areas of gliosis create a structural barrier to regeneration [3]. Reported experimental procedures for bypassing damaged areas with a nervous tissue bridge using scaffolds [4, 5]. Creation of an optimal growth environment using stem cells has been reported [6], and also cell survival and engraftment in the areas with the greatest damage [7] as well as a strong reduction in the tendency to apoptosis [8]. Stem cells on scaffolds or applied via a simple intra-amniotic injection have been postulated to promote protection and facilitate spinal regeneration and may also decrease glial reactivity and inflammation, which could improve the functional results achieved by just covering the defect prenatally. The purpose of this paper is to describe a previously unreported effect of adipose stem cells (rASC) in a model of neural damage. Our aims were to describe neurotrophic factors produced by rASC with neural protective potential, develop two methods for prenatal rASC transplantation in the teratogenic model and evaluate their effects on spinal anatomic structure and local macrophage activity and finally describe the effects of amniotic fluid on proliferation in this particular type of stem cell

MATERIAL AND METHODS

All our work was performed with approval of the Animal Care Committee of our hospital in Madrid (CEBA 14-2010 and 05-2012) and in accordance with Directive 2010/63/UE from the European Parliament and Council Spanish law (RD53/2013).

Animal model. Animals stayed in our facility with food and water ad libitum at least 48 hours prior to the first manipulations, and were housed under 12h light/dark standard conditions. The procedure for developing this animal model has been described previously [9-11]. Sprague-Dawley female rats (Charles River, Barcelona, Spain), 2 to 4 months old with a time-dated gestation were used. On Day 10 of gestation (E10), 100 mg/kg of all-trans retinoic acid (RA, Sigma-Aldrich, Tres Cantos, Spain) dissolved in olive oil was administered via orogastric tube. Control animals were administered the same amount (2 ml) of olive oil. After exposing the dams to

sevofluorane (Sevorane, Abbot, Madrid, Spain) fetuses were collected via caesarean section at E15, E17, E19 and E21, and mothers sacrificed with intracardiac saturated potassium chloride. Fetuses (38 controls and 47 MMC) were macroscopically examined in cold phosphate buffered saline (PBS), and the presence and characteristics of any lumbar defect were recorded. Whole fetuses were then fixed in 10% buffered formalin for histological processing (see below).

Skeletal staining. Five E21 MMC fetuses and 5 controls were eviscerated and their skin removed before preservation in 10% buffered formalin at ambient temperature for a period of 2 to 3 days. After rinsing with distilled water, specimens were immersed in 0.01% alcian blue 8GX (Sigma) in 80% ethanol, 20% acetic acid for 2 days. After rehydration in a graded series of ethanol (70%, 40%, 15%, 0%, 2-3h each), the material was incubated overnight with 0.5% trypsin in 30% saturated sodium borate followed by 1% KOH for another 24h to remove any excess soft tissue. Mineralized bones were stained by incubating with 0.01% alizarin red (Sigma) in 1% KOH for 24h. After rinsing several times with 20% glycerol in 1% KOH until the solution was clear, specimens were carefully incubated, 24h each, in increasing gradients of glycerol (50%, 80%) in 1% KOH, and stored in 100% glycerol at room temperature (Fig. 1).

Histological assessment. Thoracic (T9-T10) and lumbar (L2-L3 or MMC) areas were processed separately and embedded in paraffin; 5 μ m transversal sections were stained with hematoxylin/eosin and Nissl standard staining to evaluate gross alterations and basic neuronal structure in spinal cord tissue, respectively. Histopathological damage was assessed by a blind reviewer; HE sections were scored 0 to 3 for the presence of hemorrhage, inflammatory cell infiltration, gliosis and/or destructuring (0-no evidence, 3-severe damage) [12, 13]. Cell count was performed using Nissl under 40x magnification, which is equivalent to an area of 0.18 mm². Randomly areas in the dorsal horns were selected for neural cell count. The average neural cell count was calculated [14]. Digital pictures were obtained in an Olympus BX41 bright field microscope with Image-Pro Plus software (MediaCybernetics, Rockville, MD).

Immunohistochemistry/immunofluorescence. Sections were deparaffinized, rehydrated and boiled for 20 min in unmasking solution (0.1M citrate buffer, pH 6.0). After cooling to room temperature, endogenous peroxidase was blocked by incubating 10 min in 1% H₂O₂ in methanol. After rinsing with PBST buffer, samples were blocked for 1h at RT with 5% normal goat serum, 1% bovine serum albumin in PBST, and then

incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal anti-GFAP (Sigma-Aldrich) 1:500 in blocking solution. Detection was performed with goat anti-rabbit biotinylated IgG (Life Technologies) 1:100 in blocking solution for 1h at RT, followed by avidin conjugated to HRP (Vector labs) 1:300 in blocking solution for 1h at RT, and DAB as the chromogen. Sections were counterstained with hematoxylin, and mounted with DPX. For immunofluorescence detection of Iba-1 and GFP, we followed a similar procedure without peroxidase blocking. Rabbit polyclonal anti-Iba-1 (Wako, Neuss, Germany) 1:500 in blocking solution, and mouse monoclonal anti-GFP (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) 1:50 in blocking solution, were used as primary antibodies. Detection was performed with Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Life Technologies), respectively. Nuclei were counterstained with DAPI. Digital pictures were obtained in a Leica DMI6000B fluorescence microscope with LAS AF software (Leica Microsystems, Barcelona, Spain).

Cellular forms of microglia were described as follows. Resting microglia have a small oval cell body and numerous small diameter processes radiating from the soma extending several times the diameter of the cell body in length; they have been characterized as highly down-regulated or inactive macrophages. Activated microglia are swollen ramified cells characterized by a larger cell body with shorter processes. Reactive microglia are small spherical cells with an amoeboid-like morphology that could be considered fully activated macrophages with migratory properties. For our purposes we considered activated microglia as the prior step to step before reactive microglia and both types were studied together [15-18]. A four-point scale was used [19]: 0, normal, <10% reactive cells; 1, mostly resting, about 30% reactive cells; 2, some resting cells present, 60% reactive cells; 3, 100% reactive cells. Dorsal horns were studied at 20x magnification.

ASC procurement. Adipose-derived MSC were isolated using a method described for human adipose tissue [20] Subcutaneous fat was removed from adult Sprague-Dawley rats, washed in PBS, digested with type I collagenase for 30 min at 37°C and cultured in DMEM, 1g/l D-glucose (Life Technologies), containing 10% fetal bovine serum (Life Technologies) and antibiotics (penicillin/streptomycin 1%, Sigma). Cells were transduced with retroviral particles to express green fluorescent protein (GFP), kindly donated by Prof. L. Naldini (Telethon Institute, Milan, Italy) and produced by Dr. G. Güenetxea (CIEMAT, Madrid, Spain). ASC were characterized per In-

ternational Society of Cell Therapy recommendations [21, 22], due to their adipogenic and osteogenic differentiation, production of fibroblastoid colonies, and immunophenotype by flow cytometry (CD29+, CD90+, CD11b-, CD45-).

Neurotrophic factor expression in ASC. Subconfluent cultures of ASC were used to obtain total RNA with TRIzol® reagent (Life Technologies) as per manufacturer's recommendations. Complementary DNA synthesis was performed with MultiScribe™ Reverse Transcriptase and oligo (dT)₁₆ (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to manufacturer's recommendations. Standard PCR was performed with 1u DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) and 0.5 µM each oligonucleotide (Table 1), for 35 cycles of 30s at 95°C, 30s at 60°C, and 30s at 72°C. PCR fragments were analyzed in 1.7% agarose gels containing 1x RealSafe (Durviz, Valencia, Spain) with a digital photodocumentation system (Alliance 2.7, UVitech, Cambridge, UK).

ASC in vivo transfer. On E18, maternal anesthesia was induced and maintained using inhaled sevoflurane at 8% in 100% oxygen; a midline laparotomy was performed and 2 or 3 fetuses with or without the defect were exposed. ASC were transferred using one of two methods:

- 1) ASC from subconfluent cultures were resuspended in Ringer lactate (2x10⁶/50µl) and introduced in the amniotic cavity using a Hamilton syringe with a 30-gauge needle.

- 2) ASC from subconfluent cultures were resuspended in culture medium (2x10⁶/50µl) and applied onto polycaprolactone discs, 3.5 mm in diameter and 1 mm thick (Metis Biomaterials, Valencia, Spain); after 1h at 37°C for cell attachment to the biomaterial, culture medium was added to the wells and the plate was incubated for 24h more in a CO₂ incubator at 37°C. A purse-string suture was performed in the uterine wall over the fetal defect and through a 2mm incision one disc with or without cells was set over the defect and fixed using cyanoacrylate glue. After that, the purse string suture was closed, the dams were allowed to recover from anesthesia and gestation continued (Fig 2 and 3).

Amniotic fluid influence over ASC cytotoxicity/cell proliferation. Amniotic fluid (250-300 µl) was collected from E17 and E19 fetuses with insulin syringes and with care not to damage the fetuses; samples were centrifuged for 10 min at 10000xg and supernatants were stored at -80°C. ASC were plated in 96 well plates (2x10³/well); after 24h, medium was removed and changed for new medium containing PBS or amniotic fluid (2:1), following the incubation for 48h more. Lactate dehydroge-

nase (LDH) was assessed as an indirect method for detecting cellular cytotoxicity and cytolysis as per manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). For the cell proliferation assay, WST-8 reagent (CCK-8 kit, Sigma-Aldrich) was added and absorbance at 450 nm measured 3h later.

Statistical Analysis. The results were expressed as percentages or as means \pm SD, and groups were compared by one-way analysis of variance with Tukey's multiple comparison test, Student's t test or non parametric tests, where appropriate, with a threshold of significance at $p < 0.05$. Analyses were performed using SPSS and Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA).

RESULTS

Animals with MMC (approximately 60% of fetuses from RA-treated rats) presented lesions only in the lumbar/sacral area, and the lesions were similar to those found in the human disease. Macroscopically the fetuses showed the MMC defect in which the dorso-lumbar skin and the bony arch were open and the meninges fused, exposing neural tissue in lumbar areas. Alcian blue/alizarin red staining of skeleton showed dramatic alterations in lumbar/sacral region in MMC fetuses, with frequent elimination or reduction in vertebrae below the level of the lesion (Fig. 1).

Histopathological analysis. In MMC, neural plate and dura position were similar to the human defect, with loss of normal anatomical structure. The MMC lumbar defects studied showed abnormal pattern in dorsal areas and a paucity of mature neurons. There were also multiple areas of vacuolization, gliosis and atrophy. Additionally there were areas of edema, focal calcification, fibrosis and capillary cell proliferation (Fig. 4, A, B and C). Nissl staining showed flattening of the dorsal horns and gross distortion with elongation of the central channel and areas of ependymal denudation (Fig. 4B). Animals treated with the scaffold without cells presented fibrous tissue layering with different degrees of hemorrhage, as also observed in animals treated with scaffold and cells (Fig. 4 A, B and C).

Spinal Cord Damage Score. Spinal cord damage increased during gestation, being more severe in lumbar areas (mainly at term, with damage degrees near 3), compared to thoracic ones. Almost no structural changes were observed in areas without expo-

sure to amniotic fluid, and these changes were probably related to tissue manipulation (Fig. 5). At term, animals treated with patch coverage presented a wide variation in gliosis, hemorrhagic areas and structural changes but all were similar to those without prenatal coverage. No benefits at this point could be described as related to either cell injection or placement of a scaffold with or without cells. *Cell neural count.* A decrease in total neural cell density was observed in dorsal horns at day 21 in MMC; this effect was mildly attenuated in animals treated with cells/*ASC-treated animals* (n.s.).

GFAP immunohistochemistry. Controls showed a light brown staining. Non-treated MMC presented an increase in staining degree observed as dark brown color, dark brown cells (astrocytes) and a remarkable paucity of motoneurons, observed as pale purple cells. Animals treated with the scaffold alone showed an intermediate degree of staining while animals treated with a scaffold and cells presented a marked absence of staining and motoneuron preservation in areas close to the scaffold (Fig. 4C).

Iba-1 immunofluorescence. The absence of Iba-1 staining was almost complete in normal animals. The staining was diffuse in MMC and in animals treated with just the scaffold, and the latter also presented a bilateral increase in immunoreactivity. Decreased dorsal horn staining was observed in animals treated with scaffolds and cells (Fig. 4D). Controls showed a constant expression of mainly resting microglia all through the gestation. Animals with MMC at E21 showed a clear transformation towards reactive/activated cells in dorsal horns where resting microglia were scarce to almost undetectable. Finally, this microglial activation related to spinal trauma produced by amniotic fluid exposure was ameliorated in animals treated with cells. Animals with scaffold and cells seemed to present higher degrees of preservation (1 ± 0.5) when compared to those receiving the injection (1.5 ± 0.5). Both types are considered together in figure 6 (E21 Cells vs E21 MMC).

Cell detection via antiGFP immunofluorescence and neurotrophic factor production. Although uncommon, engraftment was observed in some areas of damaged neural tissue when cells were delivered via injection (fig 7). No cells were observed in the spinal cord when delivery was made via scaffold. ASC in vitro produced different neurotrophic factors related to neural protection (Table 1).

Amniotic fluid cytotoxicity. A well-described method for assessing the cytotoxicity of a particular substance is based on measuring extracellular LDH. In our study, prenatal surgery employing the scaffold would theoretically protect cells from the

effects of amniotic fluid by the addition of a plastic layer coating. On the other hand, a simple injection allows amniotic fluid to interfere with cell proliferation, so we reproduced this scenario in vitro. Amniotic fluid from MMC and control fetuses was collected at different days of gestation; at term amniotic fluid was more viscous and scarce, in fact almost impossible to collect properly so just liquids from E17 and E 19 were chosen for this purpose. First we assessed LDH in amniotic fluid, observing a significant increase in LDH over the gestation, with these levels being higher than those found in culture medium containing 10% FBS. Nevertheless, after a 48h incubation period, amniotic fluid does not seem to have any cytotoxic effect on ASC, which secreted similar LDH levels with culture medium and with amniotic fluid. On the other hand, ASC treated with amniotic fluid presented a significant increase in cell proliferation although liquids obtained during/at advanced gestation had a less positive effect (Table 2).

DISCUSSION

Myelomeningocele appears by the 4th week of gestation in humans as an exposure of spinal cord neural tissue and absence of a protective vertebral posterior arch closure. Several reports describe the well known «two-hit» hypothesis, based on an initial injury related to some kind of maldevelopment and a second damage based on prolonged neural exposure to amniotic fluid and meconium. Many authors have suggested that this second hit is by far the most important so prompt fetal neurosurgery could ameliorate this damage and improve future prognosis [1,23-25]. Human stillborns present little damage at early stages of gestation, fetal leg movement is usually normal early in gestation and experimental work has shown the deleterious effects of amniotic fluid on neural tissue [25]. These symptoms are mainly related to the presence of paraplegia and urinary or fetal incontinence and the severity will be determined by the level of the lesion [1,23].

The American MOMS trial with prenatal two-layer closure has reported substantial improvements in terms of hindbrain herniation and neurocognitive development [2]. Improvements in urinary symptoms or lower extremity function have been less remarkable, which is probably related to the relatively late onset of the protective me-

chanism of fetal surgery. In MOMS, prenatal repair was associated with a significantly increased ability to ambulate at 30 months compared to the postnatal repair group. This improvement has encouraged a wider search for different strategies to further improve distal neurological function. It might be enhanced if fetal surgery could be performed earlier, but this is strongly limited by tissue fragility; however methods based on different techniques of fetoscopic coverage have been proposed [26-28]. The second strategy could be based on the addition of stem cells with a proven capacity to enhance axonal growth, neuronal regeneration and down-regulate glial stimulation and scar formation.

Fetal treatment with stem cells is attractive due to the theoretical immunotolerance to foreign cells and due to the rapid growth of the fetus that provides an opportunity for engraftment and expansion. This strategy has been experimentally tested by others, achieving cell engraftment of neural stem cells with neurotrophic factors in fetal lambs [7], improvement in motor functions [29] and reduction of spinal apoptosis in the spinal cord using this same model [8].

Structural changes and injury scores in the placode and thoracic spinal cord during gestation (HE, Nissl, GFAP)

Several reports describe how spinal cord damage in MMC increases over the course of gestation. This has been related to exposure of neural tissue to amniotic fluid and, after the 34th week, to urine and meconium. This progressive damage is defined by disruption of dorsal architecture and by the presence of several changes related to inflammation, gliosis and finally fibrosis and vacuolization [3,25]. Our observations here were similar to earlier reports and agreed in the description of this second hit as a dynamic procedure, worse at the end and mild at the beginning. On the other hand, we found some distortions in the thoracic areas that were not directly exposed to amniotic fluid; these anomalies were scarce and perhaps some of them related with tissue manipulation. As others have suggested, the clinical impact of the second hit is dramatic in lumbar areas when compared to the mild structural changes only related to imperfect development [30]. The absence of improvement in the damage score or neural count after prenatal coverage or cell delivery in our study in

rats could probably be related to the model itself. It is difficult to successfully treat the lumbar area before day 17 due to tissue fragility; it is probably too late and the scaffold or cell protective effect is minimum with just three days of evolution before birth. These results are different to those described by Diagini who describe different degrees of defect coverage using placental and amniotic fluid derived stem cells via intraamniotic injection [31, 32].

Some benefit could be suggested from patch coverage when GFAP is studied. There was a decrease in staining intensity in MMC covered with a scaffold with or without cells. On the other hand, the scaffold induced a tiny fibrous tissue layer, probably produced by local inflammation that should be considered a negative effect of the coverage.

Role of microglia in MMC spinal cord injury (Iba-1)

Microglia cells were characterized by the del Rio-Hortega method and serve as resident tissue macrophages within the central nervous system (CNS) [14-18]. In order to detect neural tissue damage they express receptors that recognize pathogens and different factors produced by injured neural cells. In the healthy neural tissue microglia are in a resting status and have a dendritic shape with long processes; in response to injury they change to an amoeboid morphology with the ability to migrate toward affected areas [14]. Microglia present a nonspecific upregulation in response to tissue damage and most models attempting to explain their behavior are based on traumatic injury (contusion, compression or hemisection) [18] therefore, any technique involving injury should induce their activation. Activated microglia release pro-inflammatory mediators that contribute to cell death and neuronal dysfunction through the NADPH oxidase enzyme pathway. Neural tissue damage on the MMC placode has been extensively described and although it is a chronic damage [25], pathways of microglial response should be similar to those in any other traumatic insult. As far as we know microglial activity has not been previously described in the fetal MMC placode of this model. Short term microglial activity is not considered harmful for neural tissue; in fact it could have several protective methods of contributing to neural preservation and axonal growth. On the other hand, chronic microglial activation is considered the most da-

maging response of microglial cells to injury; in fact interactions between chronically damaged neural tissue and hyperactivated microglia trigger a vicious self-propagating positive feedback that produces uncontrolled cell death and progressive destruction. The end of this process is demyelination, axonal degeneration, cavitation and glial scarring, which act as a structural barrier to new axonal growth [14,18]. Different anti-inflammatory substances have been reported to reduce microglial-related neurotoxicity such as minocycline or some cytokines [33,34]; rASC have been described to have immunomodulatory properties in neural tissue damage, but their actions on microglia in damaged neural tissue have never been assessed in this scenario before. The improvement seems to be more relevant in animals treated with the scaffold; the presence of living cells in the membranes after 72 hours suggests that this beneficial effect could be produced by the creation of an optimal local environment. No ASC were observed engrafted in damaged spinal cord if delivered this way. The modification of microglial activation was less notable if the cells were injected, but in this case cells were found engrafted in damaged neural tissue. It is difficult to understand how such a small number of engrafted cells could be associated to any beneficial effect, perhaps in this model the scarce amniotic fluid allows paracrine effects of these cells just injected. We do not know if cells attached to the scaffold lose their ability to migrate, but it is very likely that the cells do not lose their secretory capabilities. Maybe the limited time in between cell transplantation and the animal samples harvest did not allow these cells to migrate out the scaffold to engraft in the injured spinal cord.

Amniotic fluid toxicity

Several authors have described amniotic fluid toxicity for neural tissue in MMC models [35, 36]; on the other hand, prolonged exposure is an important aspect of the damage, and the short gestation in the rat model is a limitation for extrapolating these results to human disease. Our findings describe an absence of damage to ASC after a 48-hour culture with amniotic fluid, suggesting that simple injection could be an adequate method to deliver cells in human disease. Furthermore, we found some improvement in cell proliferation that could be related to the presence of different growth factors in amniotic fluid during the middle gestation period.

How could mesenchymal stem cells produce favorable effects over areas of spinal cord damage in this particular scenario?

Several reports have described paracrine anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells, making them attractive candidates for this purpose. They could produce positive effects in an acute phase: secretion of neurotrophic factors with positive effects on neuron survival, hampering the proper function of natural killer cells; and, in the chronic phase, promyelinating abilities and positive effects on the degradation of cellular matrix, which is important for axonal regrowth [37]. In our study we have failed to observe any positive effect on local fibrosis, gliosis or beneficial effects on structural changes or neural cell number related with cell delivery. A probable explanation is a limitation in a model with such a short period of cell exposure within the damaged area, that don't let these new cells to migrate, allow axonal growth and create connections. Another animal model with longer gestational age could ameliorate this factor. On the other hand, we have found survival of the cells in the scaffold after the treatment, engraftment in damaged areas when they are injected and modifications of microglial expression with potential benefits in the long term with both surgical procedures. The results do not demonstrate structural improvement but we did find positive effects suppressing inflammation and glial reactivity, probably due to secretion of neurotrophic factors and the creation of a less damaging growth environment.

Limitations

Several aspects could limit the impact of our conclusions: 1) Potential beneficial effects of cells have been described here but the exact way they are achieved is not fully understood. 2) The most appropriate way to deliver cells needs to be established, adding a scaffold with ingrowing cells seems to be the most reasonable way although harmful effects could be produced due to the direct contact between the synthetic patch and neural tissue. Simple injection as a useful delivery method seems to be quite difficult in the human malformation where the amount of amniotic fluid is greater, limiting the possibilities of achieving cell engraftment in the spinal cord.

3) Timing of cell delivery to achieve the best results is not known. 4) Microglial activation has a beneficial side for spinal cord regeneration; it has some role in tissue regeneration through remyelination. 5) CD68 as a marker of phagocytic activity and Major Histocompatibility Complex Class II (MHCII) immunoreactivity could have added valuable information about inflammatory state of microglia 6) In humans, amoeboid microglia have been described as a transient population during gestation, and although we have not found this in the model and we have studied proportions of resting/reactive cells it could have some effect on our perception of microglial reactivity.

Acknowledgments

Thanks must be given to Carol F. Warren, Dr. Jose Miguel Mariño, Paco, Dr. Gámez, Dra. Carlota Largo, Carlos, Ane and Roberto for their indispensable friendship and constant help. Our gratitude should also be extended to the personnel from the Experimental Department: Isabel, Maria Antonia, Pablo, Pedro and Belen, for their endurance and veterinary care. From HULP/ISCIII, my special gratitude to Fernando de Miguel. From Puerta de Hierro Hospital thanks must be given to Alfonso and the superb technicians group. Fundación Mutua Madrileña 2012 also supported this work to J.L.E, and Fundación Mapfre 2012 to FdM. MdF was a recipient of a predoctoral fellowship from Ministerio de Ciencia e Innovación (BES-2008-007397). FdM is a recipient of a Miguel Servet II Researcher Fellowship (CPII13/00006)

Legends of the figures

Figure 1. External appearance of the typical MMC lumbar defect in the teratogenic model. Osseous lumbar defect assessed with alcian blue-alizarin red.

Figure 2. Scaffolds composed by nanofibers specially created for our purposes. Cells were cultured with the discs (A, B) in dishes (C, D) and the presence of the cells in the scaffolds was confirmed by immunofluorescence (E).

Figure 3. Surgical procedure: polycaprolactone disc with a plastic covering layer was set over the defect and fixed using cyanoacrylate glue. After that, the purse string suture was closed. The main steps of the procedure were previously described by Watanabe et al(9).

Figure 4. (4x) A. HE, B. Nissl and C. GFAP. No structural changes were observed in controls. In MMC, neural plate and dura appearance were similar to the human defect. Animals treated with the scaffold alone presented a fibrous tissue layering with different degrees of hemorrhage, also observed in animals treated with scaffold and cells. The MMC dorsal defects studied showed abnormal patterning in dorsal areas and a paucity of mature neurons. There was also a paucity of neurons and multiple areas of vacuolization and gliosis and atrophy. There were also areas of edema, focal calcification, fibrosis and capillary cell proliferation **D. Iba-1.** Amelioration of microglial activation was only observed in the dorsal horns of animals treated with cells and scaffold.

Figure 5. (5x) A decrease in total neural cell density was observed in dorsal horns at day 21 in MMC, this effect was not observed in controls and was mildly attenuated in animals treated with cells (1) Scaffold, (2) Injection (n.s.). **Spinal cord damage score.** Spinal cord damage increased during gestation ($p < 0.05$ in thoracic areas at E17), being more severe in the lumbar areas (mainly at term) compared to thoracic areas. Some structural changes were observed in areas not exposed to amniotic fluid. No benefits regarding neural cell count or spinal cord damage were observed related to cell therapy.

Fig 6. (63x) A progressive activation of microglia in the dorsal horns is observed during gestation, this effect is down-regulated in these same areas if animals were treated with cells prenatally ($p < 0.05$). A. Resting microglia. B. Activated microglia. C and D. Reactive microglia.

Fig 7. (20x). Dorsal areas. Cell engrafted in damaged neural tissue after cell injection (GFP).

Table 1. rASC. RNA expression for different neurotrophic factors in proliferative culture (right) or after 14 days in neural differentiation culture (left).

REFERENCES

1. Adzick NS: Fetal myelomeningocele: natural history, pathophysiology, and in-utero intervention. *Semin Fetal Neonatal Med* 15:9-14, 2010
2. Adzick NS, Thom EA, Spong CY, et al: A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele. *N Engl J Med* 364:993-1004, 2011
3. Meuli M, Meuli-Simmen C, Hutchins GM, et al: The spinal cord lesion in human fetuses with myelomeningocele: implications for fetal surgery. *J Pediatr Surg* 32:448-452, 1997
4. Saadai P, Farmer DL: Fetal surgery for myelomeningocele. *Clin Perinatol* 39:279-288, 2012
5. Watanabe M, Kim AG, Flake AW: Tissue engineering strategies for fetal myelomeningocele repair in animal models. *Fetal Diagn Ther* 37:197-205, 2015
6. Saadai P, Wang A, Nout YS, et al: Human induced pluripotent stem cell-derived neural crest stem cells integrate into the injured spinal cord in the fetal lamb model of myelomeningocele. *J Pediatr Surg* 48:158-163, 2013
7. Fauza DO, Jennings RW, Teng YD, et al: Neural stem cell delivery to the spinal cord in an ovine model of fetal surgery for spina bifida. *Surgery* 144:367-373, 2008
8. Li H, Gao F, Ma L, et al: Therapeutic potential of in utero mesenchymal stem cell (MSCs) transplantation in rat foetuses with spina bifida aperta. *J Cell Mol Med* 16:1606-1617, 2012
9. Watanabe M, Jo J, Radu A, et al: A tissue engineering approach for prenatal closure of myelomeningocele with gelatin sponges incorporating basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng Part A* 16:1645-1655, 2010
10. Danzer E, Kiddoo DA, Redden RA, et al: Structural and functional characterization of bladder smooth muscle in fetal rats with retinoic acid-induced myelomeningocele. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F197-206, 2007
11. Danzer E, Radu A, Robinson LE, et al: Morphologic analysis of the neuromuscular development of the anorectal unit in fetal rats with retinoic acid induced myelomeningocele. *Neurosci Lett* 430:157-162, 2008
12. Ehrlich M, Knolle E, Ciovica R, et al: Memantine for prevention of spinal cord injury in a rabbit model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117:285-291, 1999
13. Follis F, Jenson B, Blisard K, et al: Gangliosides and spinal cord ischemia secondary to aortic cross-clamping in the rat model. *J Surg Res* 58:702-706, 1995
14. Olguner M, Akgür FM, Ozdemir T, Ozer E. Amniotic fluid exchange for the prevention of neural tissue damage in myelomeningocele: an alternative minimally invasive method to open in utero surgery. *Pediatr Neurosurg* 2000 33:252-256, 2000
15. Ransohoff RM, Perry VH: Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119-145, 2009
16. Loane DJ, Byrnes KR: Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics* 7:366-377, 2010
17. Marin-Teva JL, Cuadros MA, Martin-Oliva D, et al: Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol* 7:25-40, 2011

18. David S, Kroner A: Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 12:388-399, 2011
19. Deren KE, Packer M, Forsyth J, et al: Reactive astrogliosis, microgliosis and inflammation in rats with neonatal hydrocephalus. *Exp Neurol* 226:110-119, 2010
20. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-228, 2001
21. Dominici M, Tadjali M, Kepes S, et al: Transgenic mice with pancellular enhanced green fluorescent protein expression in primitive hematopoietic cells and all blood cell progeny. *Genesis* 42:17-22, 2005
22. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al: Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15:641-648, 2013
23. Keller BA, Farmer DL: Fetal surgery for myelomeningocele: history, research, clinical trials, and future directions. *Minerva Pediatr*, 2015
24. Meuli M, Meuli-Simmen C, Yingling CD, et al: Creation of myelomeningocele in utero: a model of functional damage from spinal cord exposure in fetal sheep. *J Pediatr Surg* 30:1028-1032, 1995
25. Carreras E, Maroto A, Illescas T, et al: Prenatal ultrasound evaluation of segmental level of neurological lesion in fetuses with myelomeningocele: development of a new technique. *Ultrasound Obstet Gynecol* 47: 162-167, 2016
26. Peiro JL, Fontecha CG, Ruano R, et al: Single-Access Fetal Endoscopy (SAFE) for myelomeningocele in sheep model I: amniotic carbon dioxide gas approach. *Surg Endosc* 27:3835-3840, 2013
27. Kohl T, Hartlage MG, Kiehitz D, et al: Percutaneous fetoscopic patch coverage of experimental lumbosacral full-thickness skin lesions in sheep. *Surg Endosc* 17:1218-1223, 2003
28. Bruner JP, Richards WO, Tulipan NB, et al: Endoscopic coverage of fetal myelomeningocele in utero. *Am J Obstet Gynecol* 180:153-158, 1999
29. Wang A, Brown EG, Lankford L, et al: Placental Mesenchymal Stromal Cells Rescue Ambulation in Ovine Myelomeningocele. *Stem Cells Transl Med* 4: 659-69, 2015
30. Northrup H, Volcik KA: Spina bifida and other neural tube defects. *Curr Probl Pediatr* 30:313-332, 2000
31. Dionigi B, Ahmed A, Brazzo J, 3rd, et al: Partial or complete coverage of experimental spina bifida by simple intra-amniotic injection of concentrated amniotic mesenchymal stem cells. *J Pediatr Surg* 50:69-73, 2015
32. Dionigi B, Brazzo JA, 3rd, Ahmed A, et al: Trans-amniotic stem cell therapy (TRASCET) minimizes Chiari-II malformation in experimental spina bifida. *J Pediatr Surg* 50:69-73, 2015

33. Lopez-Vales R, Garcia-Alias G, Fores J, et al: FK 506 reduces tissue damage and prevents functional deficit after spinal cord injury in the rat. *J Neurosci Res* 81:827-836, 2005
34. Stirling DP, Khodarahmi K, Liu J, et al: Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:2182-2190, 2004
35. Drewek MJ, Bruner JP, Whetsell WO, et al: Quantitative analysis of the toxicity of human amniotic fluid to cultured rat spinal cord. *Pediatr Neurosurg* 27:190-193, 1997
36. Al-Shanafey SN, Fontecha CG, Canyadell MA, et al: Reduction in neural injury with earlier delivery in a mouse model of congenital myelomeningocele: laboratory investigation. *J Neurosurg Pediatr* 12:390-394, 2013
37. Neirinckx V, Cantinieaux D, Coste C, et al: Concise review: Spinal cord injuries: how could adult mesenchymal and neural crest stem cells take up the challenge? *Stem Cells* 32:829-843, 2014

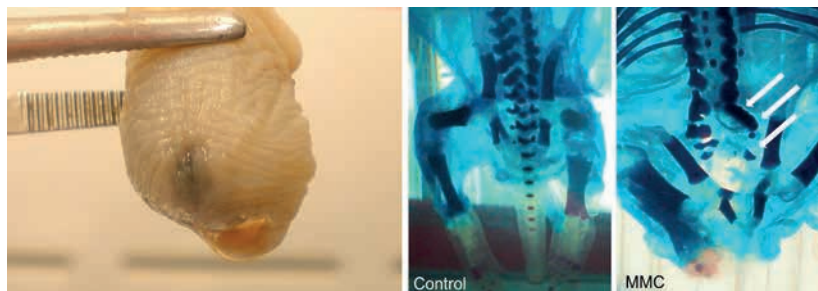


Figure 1.

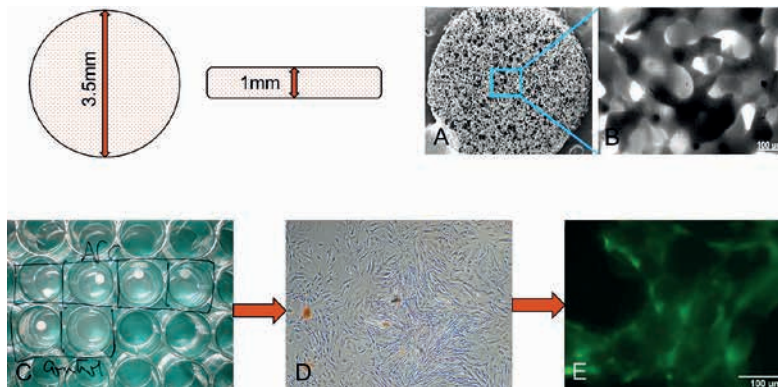


Figure 2.

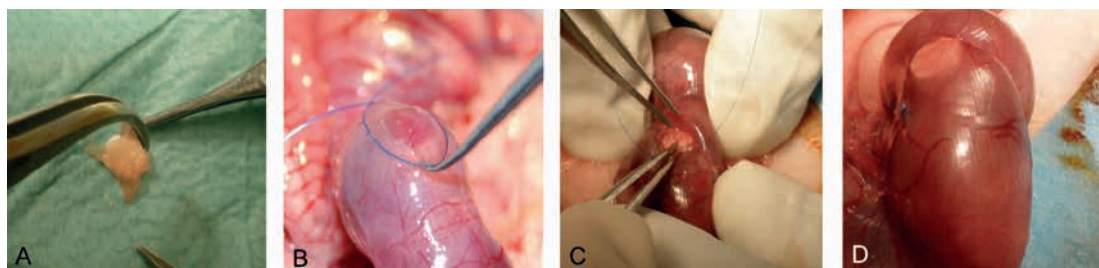


Figure 3.

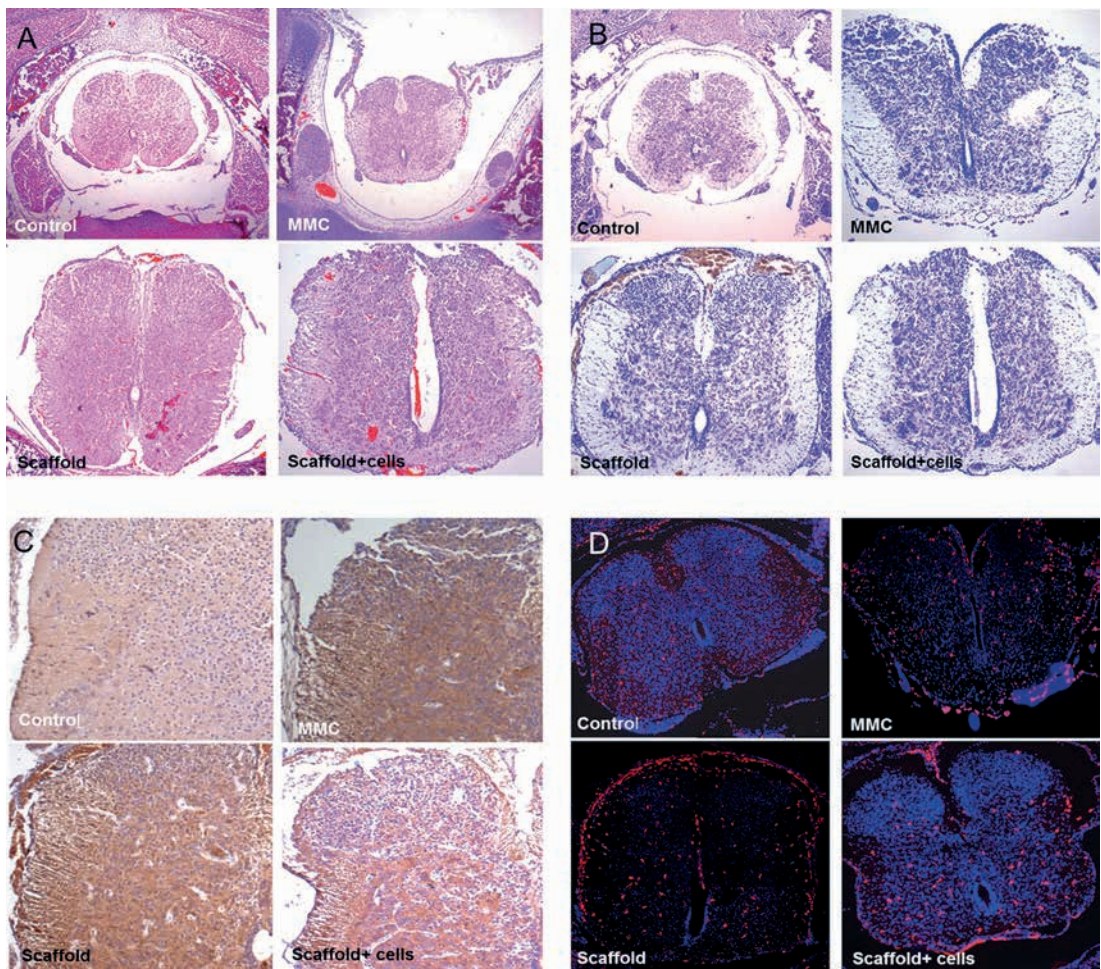


Figure 4.

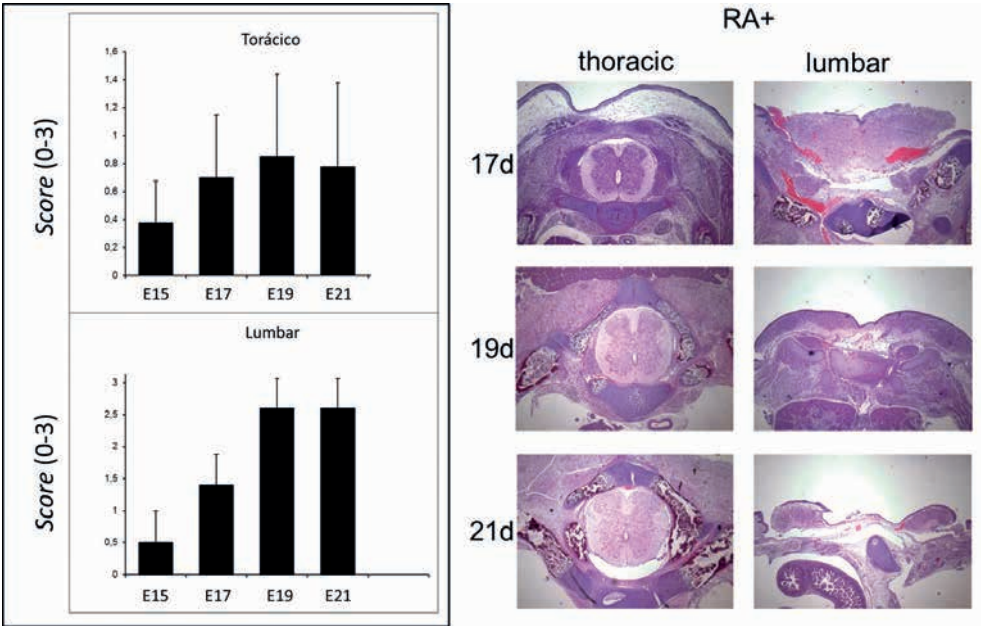


Figure 5.

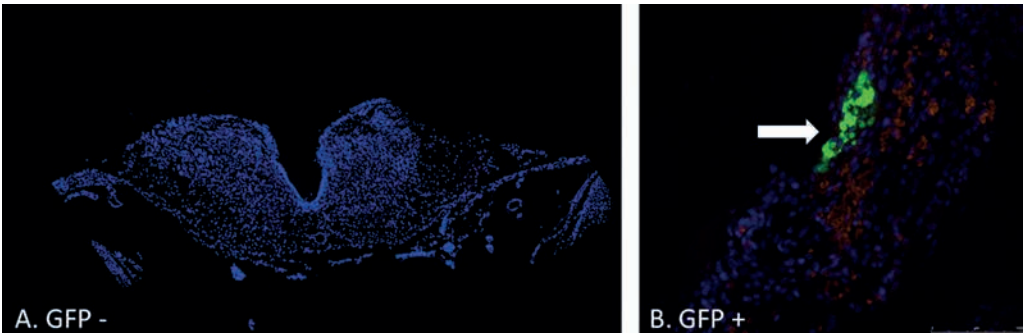


Figure 6.

rNGF FW	CCAAGGACGCAGCTTTCTAT
rNGF RV	CTCCGGTGAGTCCTGTTGAA
rBDNF FW	GATGACCATCCTTTTCCTTACTATGG
rBDNF RV	ACTATCTTCCCCTTTTAATGGTCAG
rNT3 FW	GCTGATCCAGGCGGATATCT
rNT3 RV	ATGGCTGAGGACTTGTCGGT
rGDNF FW	GATGAAGTTATGGGATGTCGTG
rGDNF RV	GGTCAGATACATCCACACCG
rIGF1 FW	GCTTGCTCACCTTTACCAGC
rIGF1 RV	AAGTGTACTTCCTTCTGAGTCT

Table 1.

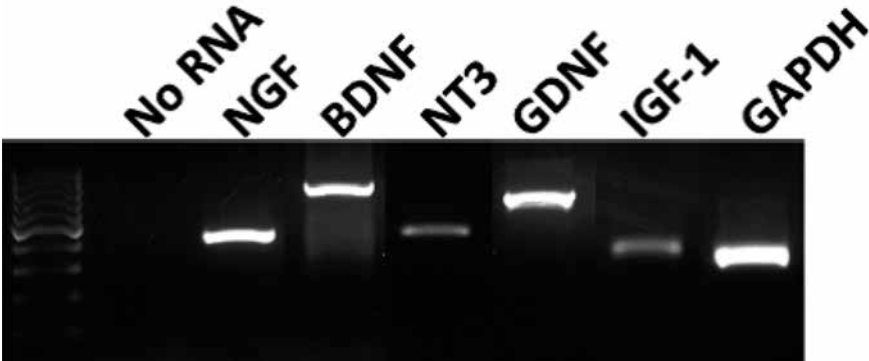


Figure 7.

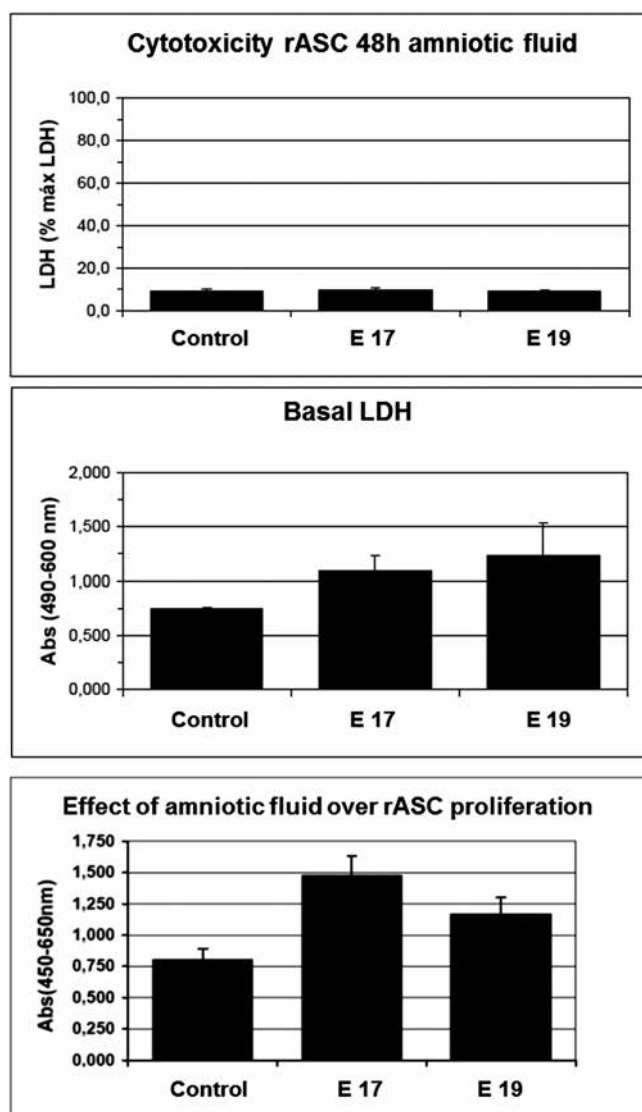


Table 2

CONGRESOS

1. **XXIst International Symposium on Paediatric Surgical Research.** Encinas JL. Brain malformations in the sheep model of myelomeningocele are similar to those found in human disease. **Leipzig** (Alemania). Octubre 2008.

2. **XLVIII Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica.** Encinas JL. El modelo de mielomeningocele en oveja presenta alteraciones cerebrales semejantes a las del humano y éstas pueden ser prevenidas mediante cirugía fetal abierta. **Sevilla**. Mayo 2009.

3. **VIII Congreso de la SECLA.** Encinas JL. Métodos alternativos de cobertura fetoscópica prenatal del defecto en un modelo de mielomeningocele. **Santander**. Mayo 2009.

4. **29th Annual International Fetal Medicina & Surgery Society Conference. IFMSS.** Encinas JL. Maldevelopment of the cerebral cortex gyrification in the surgically induced model of myelomeningocele. Shonan Village, **Japón**. Septiembre 2010.

5. **26th International Symposium on Pediatric Surgical Research.** Encinas JL. Fetal tissue engineering and cell therapy with mesenchymal stem cells in prenatal treatment of myelomeningocele: preliminary report». Comunicación oral presentada en el 26th International Symposium on Pediatric Surgical Research. **Graz**, (Austria). Septiembre 2011.

6. **31th. Annual International Fetal Medicina & Surgery Society Conference. IFMSS.** Encinas JL. Prenatal treatment with mesenchymal stem cells and scaffolds reduce spinal astroglial reactivity and local inflammation in the teratogenic model of myelomeningocele. Queenstown, **Nueva Zelanda**. Marzo de 2012.

7. **53º Congreso de la sociedad española de Cirugía Pediátrica.** Encinas JL. Cuantificación de la lesión medular en un modelo teratogénico de mielomeningocele. **Cádiz** 2014.